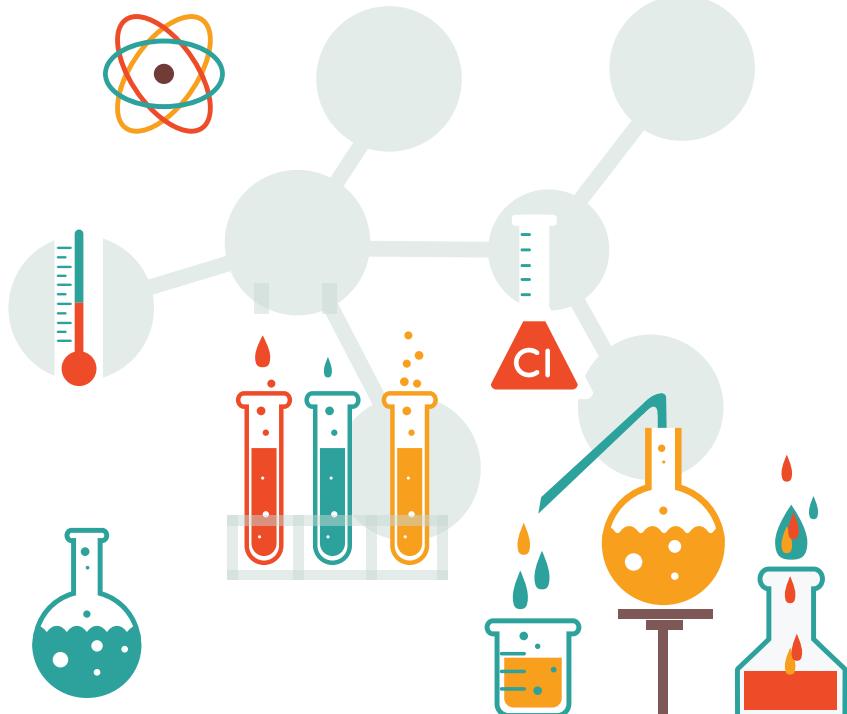


SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ

3. PROSINCE 2015



STUDENTSKÁ KONFERENCE
CHEMIE JE ŽIVOT

Vysoké učení technické v Brně • Fakulta chemická

Studentská odborná konference
Chemie je život 2015

Sborník příspěvků

Vysoké učení technické v Brně

Fakulta chemická, 3. prosince 2015

Studentská odborná konference *Chemie je život 2015*
Sborník příspěvků

Editor: Ing. Petr Dzik, Ph.D.

Nakladatel: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická,
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno

Vydání: první

Rok vydání: 2015

Náklad: 100 ks

ISBN: 978-80-214-5290-6

Tato publikace neprošla redakční ani jazykovou úpravou

Obsah

Sekce středoškolských studentů

Charakterizace pektinu	10
Jan Helán, Tereza Sklenářová	
Stanovení kovů v biologických vzorcích metodou DLTIV ICP-MS.....	11
Dudrová Markéta, Kútina Andrea	
Využití metod molekulární biologie k určení pohlaví u ptáků – natočení instruktážního videa.....	12
Jana Juřicová, Dominik Macháček	
Porovnání množství celkových polyfenolů u vybraných druhů čajů.....	13
Jitka Kovtunová	
Rtuť v rybách a vodním ekosystému ve vybraných lokalitách ČR	14
Ladislav Kabeš	
Hodnocení fyzikálně-chemických vlastností léčiv ze skupiny léčiv působících na kardiovaskulární systém	15
Tereza Kučerová	
Detekce pšeničných proteinů v masných výrobcích pomocí fluorescenční imunohistochemie	16
Martin Šotek	
Studium termodynamických a kinetických vlastností komplexotvornosti cyclodextrinů v léčivech	17
Jiří Martenek, Martin Zapletal	
Stanovení rtuti v rybích výrobcích	18
Petr Moric, Tomáš Pokorný	
Hodnocení kvality léčiv pomocí metody HPLC a TLC.....	19
Štěpánka Rikanová	
Stanovení antioxidační aktivity vybraných ovocných šťáv v závislosti na tepelné úpravě.....	20
Tereza Polanská	
Prostup biologicky aktivních látek přes membrány simulující lidskou kůži Tomáš Gazárek.....	21
Analýza vybraných buněčných markerů u primárních buněčných linií spinocelulárních karcinomů v oblasti hlavy a krku.....	22
Marek Feith	

Sekce studentů bakalářských a magisterských studijních programů
Tématický okruh organická, enviromentální a biochemie

Diversity of <i>Haematococcus pluvialis</i> strains	24
Dana Byrtusová	
Synthesis of Oxandrolone Metabolites	32
Pavol Csiba	
Využitie pokročilého Fentonovského procesu na degradáciu chlórovaných polutantov ..	42
Oľga Čížmárová	
Nanočastice v životnom prostredí a ich toxicke účinky.....	48
Adriána Drobňáková	
Nepriame stanovenie síranov metódami atómovej spektrometrie	54
Bc. Juraj Džurný	
Transformation of Lignin into Valuable Products and Their Market Price.....	60
Ludmila Hodášová	
Príprava a využití vybraných typů nanočastic v kosmetice	67
Bc. Julie Hoová	
Stanovení platinových kovů ve velkých městských aglomeracích.....	72
Stanislav Ježek	
Studium interakcí barviv s biopolymerem chitosanem	74
Pavel Kolesa	
Influence of silver nanoparticles on 2D and 3D imaging of porous collagen scaffolds.....	80
Zuzana Konecna	
Problematika stanovení betablokátorů v povrchových vodách	86
Juraj Košík	
Elektronické vlastnosti biosenzorů.....	92
Martin Netočný	
Povrchová modifikácia hydroxyapatitu pre výrobu biodegradovateľných a bioaktívnych kompozitov z polyméru kyseliny mliečnej.....	93
Bc. Martina Orlovská	
Príprava a charakterizácia mikro- a nanočastic s obsahom vybraných liečiv.....	101
Simona Sosková	
Advanced fluorescent techniques for red yeast characterization	106
Bc. Martin Vaněk	
Stanovenie arzénu atómovou absorpčnou spektrometriou a prietokovou rozpúšťacou chronopotenciometriou.....	115
Bc. Barbora Zelenayová	

*Sekce studentů bakalářských a magisterských studijních programů
Tématický okruh anorganická chemie, materiálové vědy a inženýrství*

Skúmanie pravosti odtlačkov pečatok v dokumentoch	133
Bc. Igor Arvensis	
Teoretické štúdium modelových oligotiofénov terminovaných perfluórfenylhydrazínovou skupinou	144
Bc. Denisa Cagardová	
Energetická analýza výrobne Fluidný katalytický krak.....	150
Bc. Maroš Filčák	
Stanovení dvoufotonových absorpcích průřezů Rhodaminu B a 6G	151
Silvie Hrbková	
Hybridné solárne články na plastovej PET podložke.....	153
Bc. Matej Hvojník	
Izolácia vláknitých materiálov z lignocelulózových surovín s použitím hlbokých eutektických zmesí	160
Filip Kalman	
Effect of phosphates on the hydration process of alkali activated materials	164
Kateřina Komosná	
Possibilities of Using Plasticizers in Alkali-Activated Systems.....	165
Markéta Langová	
Tepelné vlastnosti sacharózy	166
Kateřina Pecháčková	
Adheze vrstiev plazmových polymerů připravených z monomeru tetravinylsilanu.....	167
Tomáš Plichta	
Vplyv mletia a zloženia východiskových zmesí na mikroštruktúru a mechanickú pevnosť penobetónov.....	179
Bc. Veronika Sepešiová	
Príprava a využitie nanoželeza získaného z prírodných materiálov	184
Mária Solmošiová	
Suspenze oxidu titaničitého pro materiálový tisk	192
Bc. Tomáš Svoboda	
Klasifikace materiálu využívaného pro stavbu zahradních jezírek.....	202
Jiří Sykora	
Modelling of Organic Electrochemical Transistors.....	205
Jan Truksa	
Optický senzor pro UV záření	211
Bc. Andrea Třešňáková	
Svetelná degradácia kyseliny karmínovej v prítomnosti arabskej gumy	215
Bc. Dominika Vorčáková	

Sekce studentů doktorských studijních programů
Tématický okruh organická, enviromentální a biochemie

Utilization of Solid Phase Microextraction for Aromaprofile Analysis of Brewer's Malts.....	224
Karolína Adámková	
Steady-State Fluorescence Spectroscopy Techniques in Determination of Phospholipids Vesicles Properties	233
Jana Burdíková	
Analysis of Organic Compounds in Tar Produced by Thermochemical Conversion of Biomass.....	239
Radek Hájek	
Plants as a source of bioactive compounds with antimicrobial and antiurease properties	243
Sherif T. S. Hassan	
Fluorescence Study of Effect of Hyaluronan Addition to Micelle Solution of Cetyltrimethylammonium Bromide.....	244
Petra Holínková	
Determination of the Reference Genes in <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> for Real-Time PCR.....	251
Radka Hrudíková	
Comparison of magnetic nano- and microparticles application for DNA isolation from real samples.....	257
Jana Konečná	
Study of morphology the isolated cuticle from <i>Prunus laurocerasus</i>	263
Marcela Laštívková	
The utilization of freeze-drying method for solubilization of hydrophobes in the hydrophilic biopolymer environment	270
Petra Michalíková	
The Self-Degradation of Hyaluronan.....	276
Jakub Mondek	
Differential mobility spectrometry as a tool for analysis of narcotics and explosives	283
Martin Pavlačka	
Characterization of the Colloidal Properties of a Microbubble Contrast Agent	289
Tereza Pilgrová	
Application of Chemometrics Methods and Electronic Nose as a Simple and Fast Tool for the Classification of Different Types of Alcoholic Beverages	295
Silvie Surmová	
Use of passive sampler POCIS for determination of pharmaceuticals in aquatic environment	296
Richard Sýkora	
Study of catechin degradation in green tea by HPLC/MS	299
Petra Šilarová	

Determination of metabolite flux of carbon source to pigment biosynthesis in <i>Rhodotorula glutinis</i>	305
Jana Tkáčová	
Improving stability of co-amorphous drug system with addition of Polyvinylpyrrolidon.....	310
Irena Túrková	

Sekce studentů doktorských studijních programů
Tématický okruh anorganická chemie, materiálové vědy a inženýrství

Removable Parylene Based Barrier Multilayer for Corrosion Protection of Metallic Archaeological Artefacts.....	318
Lucie Blahová	
Applicability and characterization of High Power Deep UV LEDs for miniaturized portable analytical devices	319
Miloš Dvořák	
Parylene C and SiO _x bilayers for archaeological artefacts preservation	322
Jakub Horák	
Flame Retardants and Their Occurrence in the Terrestrial Ecosystem	323
Václav Chytíl	
Study of AgNPs or AuNPs Interactions with Skin Layersby IR and Raman Spectroscopy	327
Adela Jenistová	
The study of two-photon properties of derivatives diketo-pyrrolo-pyrrole	339
Jan Koutný	
Rheology of Superabsorbent Polymers	340
Romana Kratochvílová	
Measurement of Heat Capacity Using Method of Thermal Relaxation Calorimetry	347
Tomáš Mahnel	
Overview of Hydrogen Economy	356
Ing. et Bc. Jiří Marek	
Processing and characterization of long flax/thermoset biocomposites with modified interphase	368
Přemysl Menčík	
Screen Printing of Organic Electrochemical Transistor for Cardiomyocytes Research....	375
Lukáš Omasta	
Preparation of Core-shell TiO ₂ coated nanosized magnetic particles	381
Tomáš Solný	
The issue of application Ionic Liquids for the precipitation of Mordant Blue 9 from model waste water.....	382
Miroslav Šimek	

Characterization of Boron-Doped Diamond Electrodes Prepared under the Different Conditions	388
Michaela Štěpánková	
Novel Oxycellulose/Gelatin Nanofibers for Medical Applications	397
Veronika Švachová	
Preparation of Silver Nanoparticles by Reduction Using Quercetin and Testing of Their SERS-Activity	398
Marie Svecova	

Sekce středoškolských studentů

Charakterizace pektinu

Jan Helán, Tereza Sklenářová

Střední průmyslová škola chemická Brno, Vranovská 65, příspěvková organizace
chemiejecool@seznam.cz

ÚVOD

Tato práce se zabývá zkoumáním fyzikálních vlastností pektinu, jeho hustotou a ultrazvukovou rychlosí.

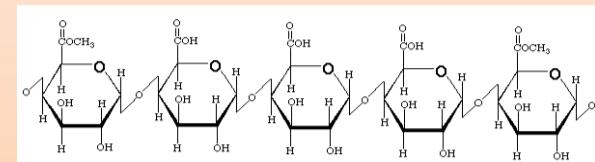
Tyto dvě veličiny vysvětlují mnohé o jeho chování v nejrůznějších prostředích, hlavně tedy i v těle živočichů.

KLÍČOVÁ SLOVA

biopolymer, hustoměr, hustota, pektin, stlačitelnost, teplotní sken, ultrazvuková rychlosí

TEORIE

Pektiny jsou stavební rostlinné polysacharydy. Vyskytují se převážně v ovoci. Díky jejich schopnosti tvořit gely se používají jako zahušťovadla do marmelád.



Obr. č. 1 – Příklad pektinového řetězce



Obr. č. 2 – Přístroj Anton Paar DSA 5000M

Měření hustoty a ultrazvukové rychlosti jsme prováděli v laboratoři Biokoloidů na hustoměru DSA 5000M od firmy Anton Paar.

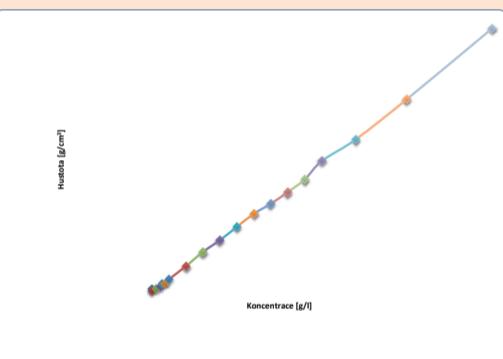
Hustota
 $\rho = [\text{kg}/\text{m}^3]$

Ultrazvuková rychlosí
 $v = [\text{m}/\text{s}]$

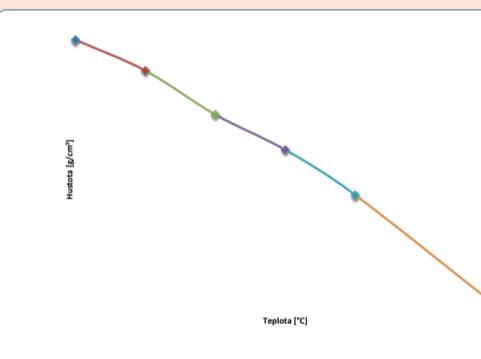
Stlačitelnost
 $\beta = [\text{Pa}]$

VÝSLEDKY

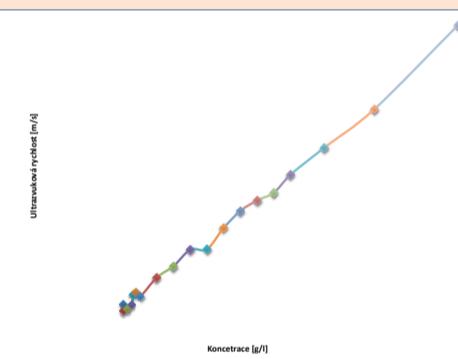
Chování pektinu ve vodě



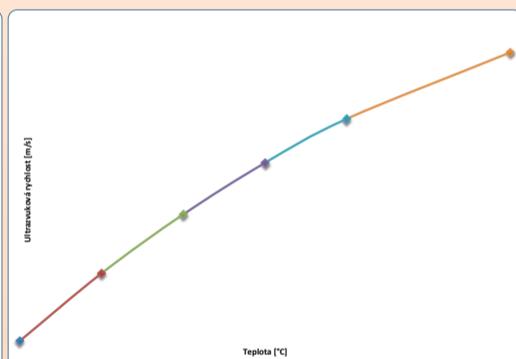
Obr. č. 3 – Graf závislosti hustoty na koncentraci při 35 °C



Obr. č. 4 – Graf závislosti hustoty na teplotě u koncentrace 3 g/l

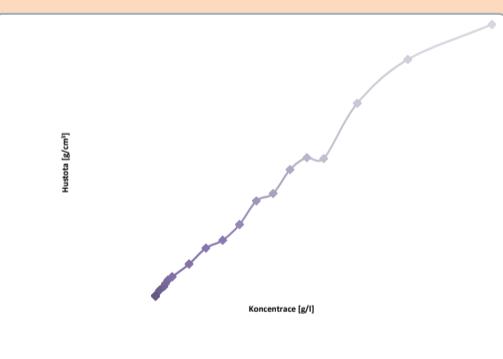


Obr. č. 5 – Graf závislosti ultrazvukové rychlosí na koncentraci při 35 °C

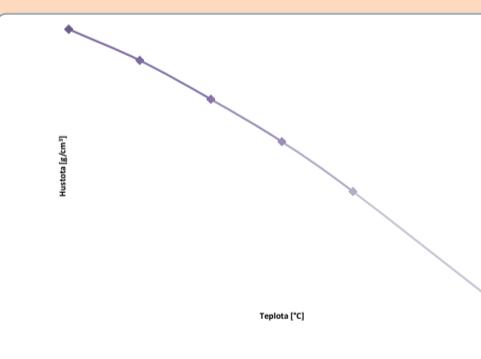


Obr. č. 6 – Graf závislosti ultrazvukové rychlosí na teplotě u koncentrace 3 g/l

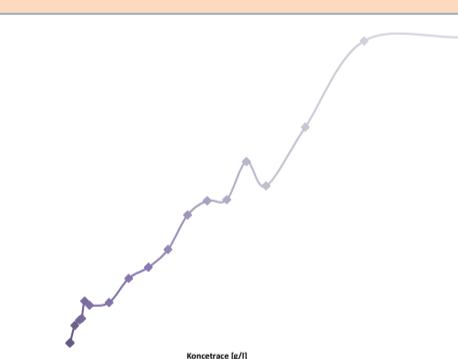
Chování pektinu v 0,15 mol/l roztoku NaCl



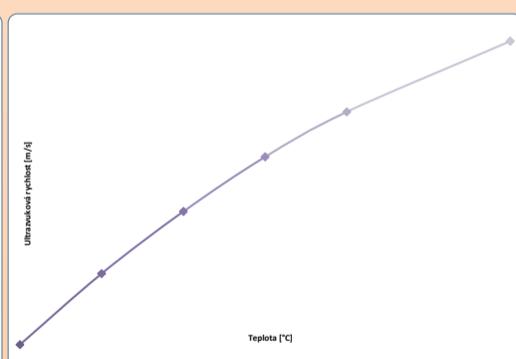
Obr. č. 7 – Graf závislosti hustoty na koncentraci při 35 °C



Obr. č. 8 – Graf závislosti hustoty na teplotě u koncentrace 3 g/l

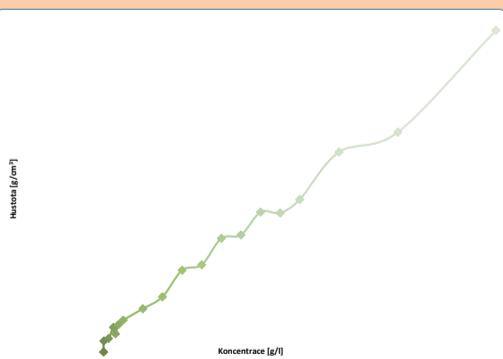


Obr. č. 9 – Graf závislosti ultrazvukové rychlosí na koncentraci při 35 °C

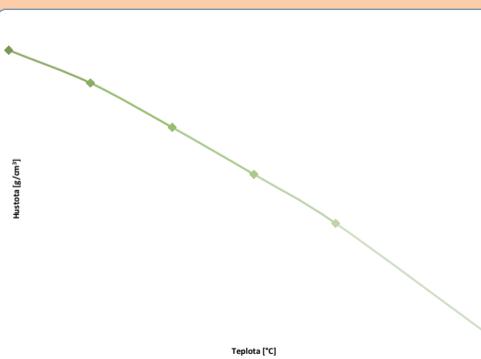


Obr. č. 10 – Graf závislosti ultrazvukové rychlosí na teplotě u koncentrace 3 g/l

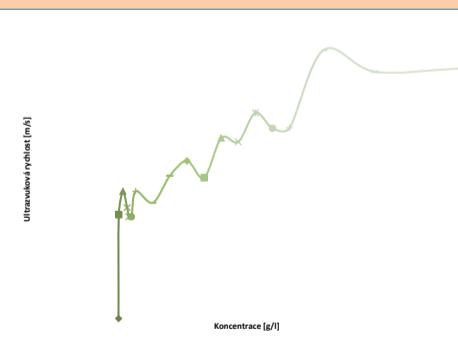
Chování pektinu v PBS pufru



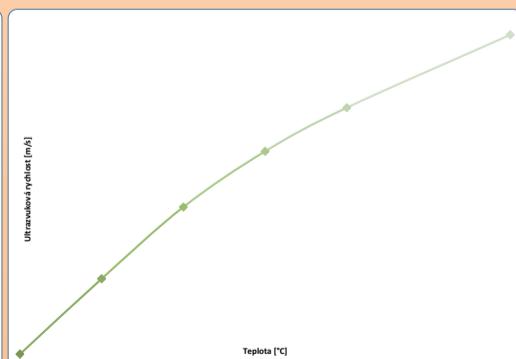
Obr. č. 11 – Graf závislosti hustoty na koncentraci při 35 °C



Obr. č. 12 – Graf závislosti hustoty na teplotě u koncentrace 3 g/l



Obr. č. 13 – Graf závislosti ultrazvukové rychlosí na koncentraci při 35 °C



Obr. č. 14 – Graf závislosti ultrazvukové rychlosí na teplotě u koncentrace 3 g/l

ZÁVĚR A DISKUSE

S rostoucí koncentrací dochází ke zvyšování hustoty. Zvyšující se teplota snižuje hodnoty hustoty. Bylo změřeno a popsáno chování roztoků pektinu za různých podmínek. Nejlepší výsledky lineární závislosti byly naměřeny, když byl pektin rozpuštěn ve vodě, kterou na sebe jako biopolymer dokáže snadno vázat.

Stanovení kovů v biologických vzorcích metodou DLTV ICP-MS

Andrea Kútka, Markéta Dudrová, Kristýna Dlabková, Antonín Bednářík, Jan Preisler
Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno



Úvod

- Těžké kovy jako železo, měď a zinek jsou pro živé organismy nezbytné, ovšem při vyšších koncentracích mohou být toxicke. Jiné kovy, například olovo, rtuť a kadmijsou pro organismus toxicke ve všech koncentracích.
- Cílem naší práce bylo stanovit obsah těžkých kovů (rtuti, mědi a zinku) ve slinách osob s různým počtem amalgámových plomb.
- Sliny lze odebrat neinvazivně a mohou mít význam v klinické analýze jako alternativa ke krvi.
- Používaly jsme metodu DLTV ICP-MS, která se skládá z hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) a z inovativní techniky tepelného odpařování diodovým laserem (DLTV).

DLTV ICP-MS

ICP-MS

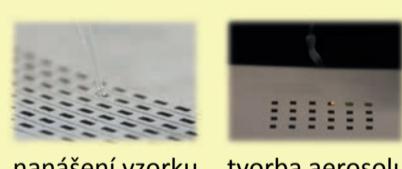
- metoda stopové elementární analýzy
- plazma: čtvrté skupenství hmoty
- indukčně vázané plazma: 6000 - 10000 °C
- ICP ionizuje většinu prvků periodické tabulky
- MS analyzuje vzniklé ionty podle poměru hmotnost/náboj



Indukčně vázané plazma

DLTV

- nová, nízkonákladová technika zavádění vzorku pro ICP-MS
- analýza vyschlých kapek na papíru
- kancelářský nebo filtrační papír s předtištěným inkoustovým vzorem
- diodový laser je využíván k pyrolyze papíru a vytváření aerosolu
- minimální objem vzorku
- zádné úpravy vzorku
- analýza složitých vzorků (krev, sliny)

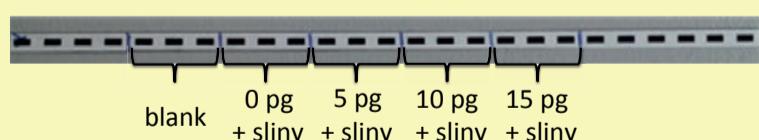


nanášení vzorku tvorba aerosolu

Metody

Příprava vzorku

- slny byly odebrány ráno před jídlem a čištěním zubů
- 200 nl slin bylo pipetováno na předtištěný papír spolu se standardy Hg, Cu a Zn vždy třech opakování



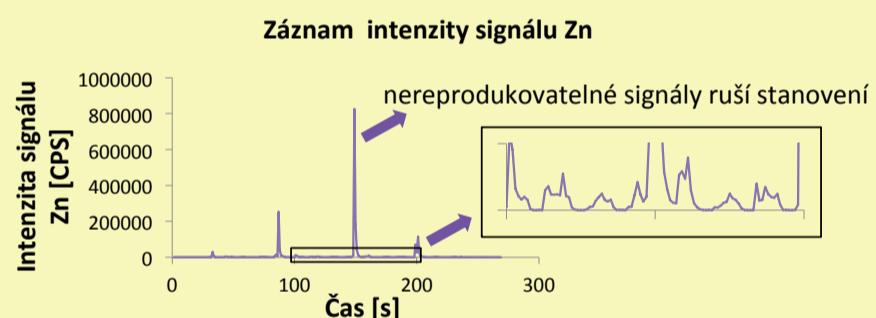
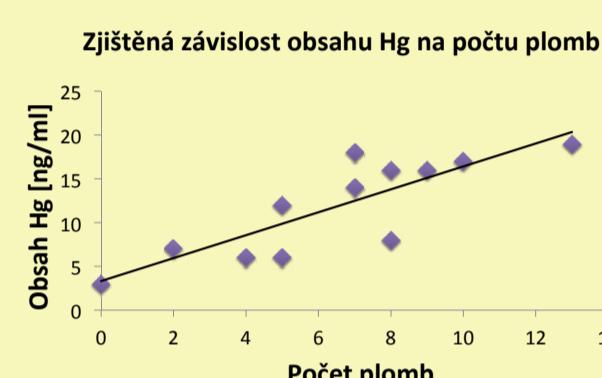
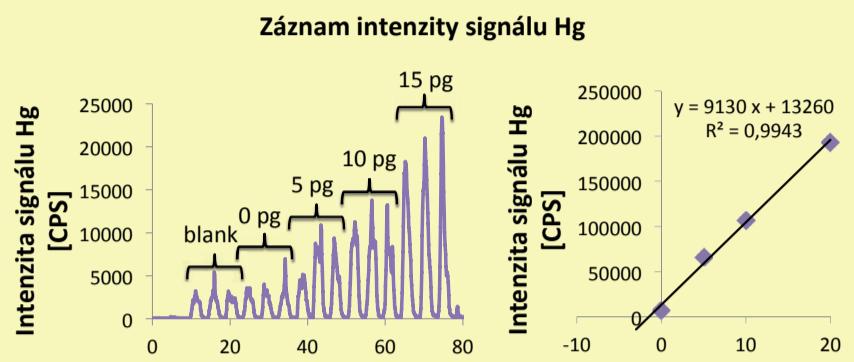
Použité přístroje

- diodový laser: 808 nm, 1,2 W (RLDH808-1200-5, Roithner LaserTechnik, Rakousko)
- ICP MS: model 7500CE, Agilent, USA: nosný plyn (He) 1,0 l/min, pomocný plyn (Ar) 0,6 l/min, integrační čas 0,1 s/isotop



Akademie věd ČR hledá mladé vědce
OTEVŘENÁ VĚDA
AKADEMIE VĚD ČR

Výsledky



Diskuze

- podařilo se stanovit obsah rtuti ve slinách osob metodou DLTV ICP-MS
- stanovení mědi a zinku neposkytovalo reprodukovatelné výsledky
- pro stanovení byly vyzkoušeny dva druhy papíru, filtrační a kancelářský
- pro stanovení rtuti byl zvolen filtrační papír, i když vykazoval vyšší pozadí pro rtut'
- nanášení na kancelářský papír bylo obtíženější a vznikaly při něm chyby, proto nebyl využíván
- obsah rtuti koreloval s množstvím plomb
- další práce bude věnována hledání vhodnějšího filtračního papíru pro stanovení těžkých kovů

Poděkování

Rády bychom poděkovaly konzultantům naší práce Bc. Kristýně Dlabkové a Mgr. Antonínu Bednáříkovi. A velké díky patří Akademii věd ČR – otevřené vědě za financování této práce.

Literatura

- [1] P. Foltyňová, V. Kanický, J. Preisler, *Analytical Chemistry*, 2012, 84, 2268
- [2] P. Foltyňová, A. Bednářík, V. Kanický, J. Preisler, *JAAS*, 2014, 29, 1585

Využití metod molekulární biologie k určení pohlaví u ptáků - natočení instruktážního videa

Jana Juřicová, Dominik Macháček

Střední průmyslová škola chemická, Vranovská 1364/65, Husovice, 614 00 Brno
j.juricova1@seznam.cz

ÚVOD

Cílem práce je primárně se seznámit s metodikou molekulární biologie při řešení jednoho konkrétního úkolu a to určení pohlaví ptáků. Sekundárním cílem této práce je následné natočení a vytvoření instruktážního videa, které je rozděleno do tří částí.

EXPERIMENT

Je prováděn hlavně u ptáků, u kterých chybí, či je nevýrazný pohlavní dimorfismus.

Rozdělení:

Příprava a izolace DNA

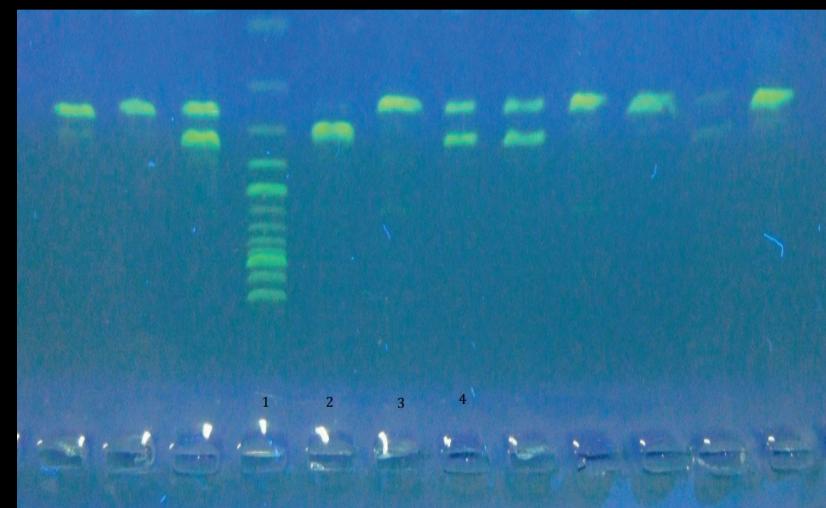
- výběr vhodného vzorku DNA
- lyzace (rozklad) pomocí lyzačního pufru (k udržení pH), enzymu proteázy K a Enázy A (spouštěče reakcí)
- inkubace tkáně s enzymy ve vodní lázně
- přenesení vzorku na izolační kolonku
- promývání pufry
- vysrážení ethanolem
- uvolnění DNA z kolonky centrifugací (odstředivka)

Polymerázová řetězcová reakce

- denaturace (oddělení vláken DNA)
- nasedání primerů (řetězec na konci vlákna)
- extenze (syntéza DNA z nukleotidů)
- nově nasynetizovaná vlákna DNA

Gelová elektroforéza

- vytvoření gelu
- naneseň vzorku do gelu
- pohyb záporně nabitéch molekul v elektrickém poli směrem k anodě
- vyhodnocení gelu



Obrázek #1: výsledek gelové elektroforézy pod UV světlem
1 - velikostní standard, 2 – neštěpený PCR produkt, 3 – samec, 4 – samice

ZÁVĚR

Naše videa se nyní používají jako jeden z hlavních materiálů při výuce na Veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně.

Děkujeme všem, kteří pomáhali při tvorbě práce:

Doc. MUDr. Eva Bártová, Ph.D. (externí konzultant)
PhDr. Marcela Helešicová (vedoucí práce)
Mgr. Ivo Papoušek, Ph.D. (figurant)

VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledkem práce jsou praktické videoukázky pro snadnější pochopení metodiky. Jsou rozděleny do tří částí podle metod (Příprava a izolace DNA, PCR, Gelová elektroforéza). Ve videích je komentář v podobě českých titulků. Videá jsou volně dostupná ke shlédnutí na YouTube.



Obrázek #2: náhled z instruktážního videa č.1 Přípravy a izolace DNA, konkrétně přidávání ethanolu pro vysrážení DNA



Porovnání celkových polyfenolů u vybraných druhů čajů



Jitka Kovtunová

Střední průmyslová škola chemická, Brno,
Vranovská 65

Čaj je nápoj, připravovaný ve vodě, vyluhováním lístků rostliny Čajovníku pravého *Camellia sinensi*. Dle stupně fermentace při zpracování lístků můžeme čaje rozdělit na zelené, černé, bílé a čaje typu oolong. Kromě povzbuzujících účinků na organismus v sobě čaj také nese celou řadu prospěšných látek. Mezi významné patří polyfenolické sloučeniny vykazující velký antioxidační účinek.

Cílem práce bylo stanovit množství celkových polyfenolů u pravých zelených čajů a čajů typu oolong, porovnání a vyhodnocení jejich vlivu na konzumenta.

V následujících tabulkách lze vidět seznamy použitého materiálu. V tabulce číslo 1 jsou uvedeny vzorky zelených čajů z vybraných oblastí Ruska. Čaje typu oolong uvedeny v druhé tabulce pochází z různých oblastí Číny a Thajwanu.

Číslo vzorku	Druh čaje, název, oblast
1	Zelený čaj, Krásnodar, vysokohorský
2	Porcováný zelený čaj, Krásnodar, vysokohorský
3	Porcováný zelený čaj, sorta B
4	Exklusive zelený čaj, Krásnodar
5	Exklusive zelený čaj, Krásnodar, vysokohorský
6	Exklusive zelený čaj, Krásnodar, vysokohorský
7	Zelený čaj, Soči
8	Zelený čaj, Soči
9	Zelený čaj, sorta A, listový, vysokohorský

Číslo vzorku	Druh čaje, název, oblast
1	Oolong Shui Xian (Vodní víla), Čína, Fujian
2	Oolong Feng Hung Dan Cong (Fénix), Čína, Quangolong
3	Oolong Hai Xian Gao Shau (Mléčný oolong), Taiwan
4	Oolong Tie Guan Yin (Železná bohyně milosrdenství), Čína, Fujian
5	Oolong Tsau Tsuu (Jarní probuzení), Taiwan

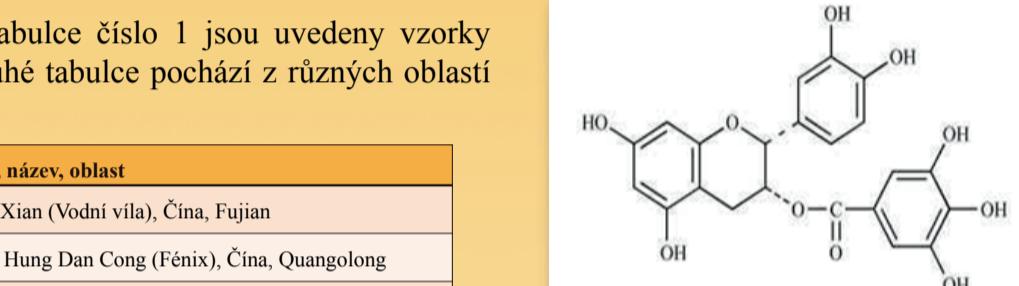
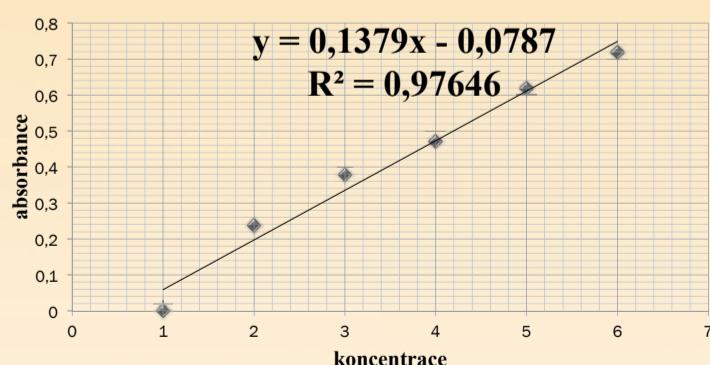
Byla sledována koncentrace celkových polyfenolických látek ve vzorcích čajů pomocí Folin-Ciocalteu testu.

Tabulka reakčních směsí v jednotlivých vzorech

	[ml]	slepý vzorek
Čaj	1	-
Folin-Ciocaltehu	5	5
činidlo		
Roztok Na ₂ CO ₃	4	4
Destilovaná voda	-	1

Dále byla provedena analýza proti slepému vzorku na UV-Vis spektrofotometru Cecil7210 při vlnové délce 765 nm. Kalibrační křivka byla sestrojena v závislosti absorbance na koncentraci kyseliny gallové (mg/ml). Každý vzorek byl přeměřen dvakrát.

Kalibrační křivka

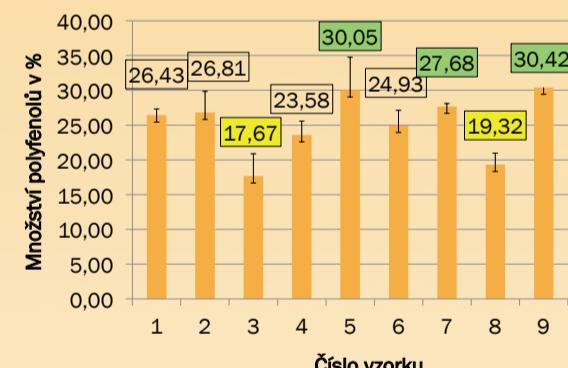


Obr. č. 2 Molekula Epikatechin gallátu

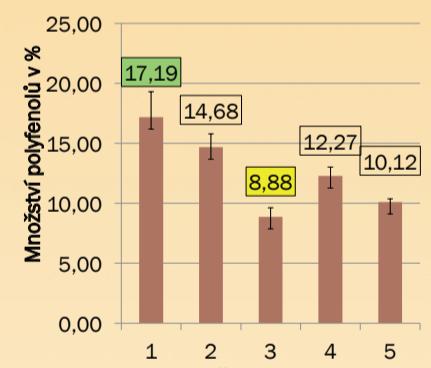
Nejvíce polyfenolických látek bylo naměřeno u pravého zeleného čaje č. 9 (30,42%). Tento čaj pocházel ze sorty A z vysokohorské oblasti. Čaje s vyšším obsahem polyfenolů měly velké, celé listy a byly převážně z oblasti Soči.

Nejméně polyfenolických látek bylo naměřeno u čaje typu oolong č. 3. Koncentrace polyfenolů u čajů oolong nepřesáhla 18%.

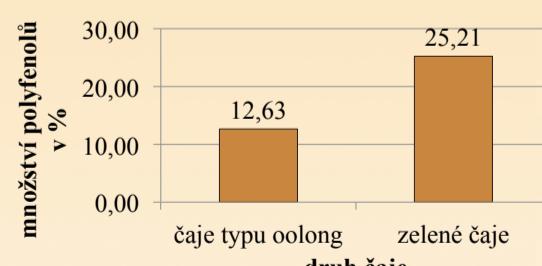
Rozdíl mezi nejvyššími hodnotami zeleného čaje a čaje typu oolong byl 13,23 % (p<0,05).



Graf č. 1 Obsah polyfenolických látek v zelených čajích



Graf č. 2 Obsah polyfenolických látek v čaji oolong



Graf č. 3 Porovnání obsahu polyfenolů v zelených čajích a oolong bez závislosti na pěstební oblasti

Závěr

Nejvíce polyfenolů obsahovaly velkolisté čaje z vysokohorských oblastí Soči. U čajů typu oolong nejvíce polyfenolů obsahovaly čaje z Číny, konkrétně Vodní Víla a Fénix.

Zelené čaje dosahovaly v průměru o 12,58 % více polyfenolických látek než čaje typu oolong (rozdíl je statisticky prokazatelný, p<0,05).

Na základě výsledků lze zelené čaje považovat za významný zdroj polyfenolických látek a jeho konzumace tak může mít příznivé vlivy na zdraví konzumenta.

RTUŤ V RYBÁCH A VODNÍM EKOSYSTÉMU VE VYBRANÝCH LOKALITÁCH ČR



Ladislav Kabeš¹, Andrea Kleckerová², Pavel Kučera¹

¹Střední průmyslová škola chemická Brno, Vranovská 65, 614 00, Brno

²Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

Andrea.kleckerova@mendelu.cz, Zemědělská 1, 613 00, Brno

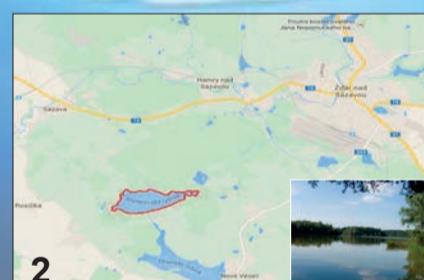


ÚVOD

Kontaminanty životního prostředí, jako jsou těžké kovy, se ve vodních ekosystémech mohou kumulovat v rybách a po té jsou potravním řetězcem přenášeny do lidského organismu. Z toho důvodu je nesmírně důležité kontrolovat obsahy těžkých kovů v rybí svalovině, a tak sledovat zdravotní nezávadnost konzumovaných ryb. Cílem naší práce bylo zjistit obsahy rtuti ve svalovině a v játrech kapra obecného (*Cyprinus Carpio L.*), dále pak v sedimentech, vodní trávě a ve vodě ve třech vybraných lokalitách České republiky.

EXPERIMENT

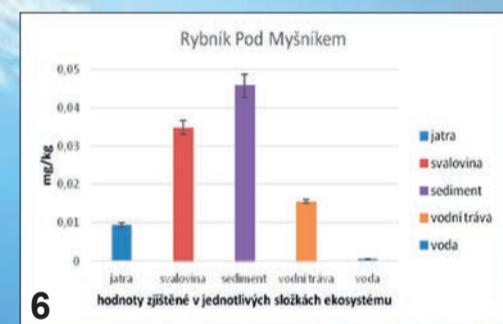
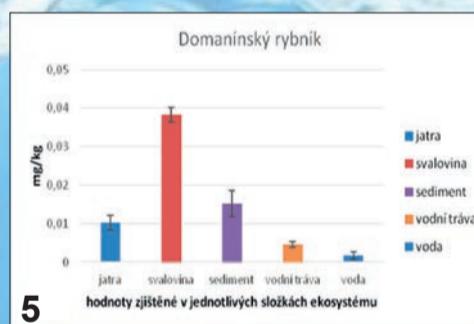
Pro naši studii byly vybrány dvě lokality v okresu Žďár nad Sázavou (Domanínský rybník (Obr. 1) a Matějovský rybník (Obr. 2)) a jedna lokalita v okrese Blansko (rybník Pod Myšníkem). Odběr vzorků probíhal v období od dubna 2013 do října 2014. Z lokality Domanínský rybník bylo odloveno 10 ryb a z lokalit Matějovský rybník a rybník Pod Myšníkem vždy po třech rybách. Dále bylo z každé lokality odebráno 5 vzorků sedimentů, 3 vzorky vodní trávy z druhu Ostřice a 5 vzorků vody. Vzorky sedimentů a rostlin byly vysušeny za přístupu vzduchu při laboratorní teplotě. Pro celkové stanovení rtuti ve svalovině, játrech, sedimentech, rostlinách a ve vodě byl použit atomový absorpční spektrometr AMA 254 (Altec, Praha).



Obrázek 1 - 4: 1. Domanínský rybník; 2. Matějovský rybník; 3. rybník Pod Myšníkem; 4. AMA 254

VÝSLEDKY A DISKUSE

Při porovnání celkových obsahů rtuti ve tkáních kapra obecného v rámci jednotlivých lokalit byly nejvyšší hodnoty nalezeny v lokalitě Domanínský rybník, avšak při porovnání celých ekosystémů se jeví jako nejvíce znečištěná lokalita rybník Pod Myšníkem. Byly zde zjištěny dvakrát vyšší koncentrace rtuti ve vzorcích sedimentu odebraných z hráze, tudíž i celkové obsahy rtuti v sedimentech jsou zde vyšší. Nižší obsahy rtuti v rybách z této lokality mohou být zapříčiněny malým počtem vzorků, proto bude monitoring této lokality probíhat i nadále.



Obrázek 5 - 7: 5. Celkové obsahy rtuti v tkáních kapra obecného a ve složkách ekosystému ve vybraných lokalitách České republiky

ZÁVĚR:

Naměřená data byla ve všech případech ve shodě s legislativními normami – 0,5 mg/kg (Nařízení Evropské komise (ES) č. 1881/2006, kterou doplňuje Nařízení Evropské komise (ES) č. 420/2011). Konzumace kapra obecného podle naší studie z hlediska obsahu rtuti nepředstavuje žádné zdravotní riziko pro konzumenta.

HODNOCENÍ FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH VLASNOSTÍ LÉČIV ZE SKUPINY LÉČIV PŮSOBÍCÍCH NA KARDIOVASKULÁRNÍ SYSTÉM

Tereza Kučerová

Střední průmyslová škola chemická, Vranovská 65, příspěvková organizace,
614 00 Brno-Husovice, kucerovatereza97@seznam.cz

ÚVOD

Laboratorně byl připraven lidokain, kyselina acetylsalicylová, nifedipin a propranolol, u kterých byly následně určovány fyzikální a chemické vlastnosti: teploty tání, stupeň zbarvení a další, které byly porovnávány s předpisy v Českém lékopise pro zjištění, zda by se tyto látky mohly v praxi využít k léčbě. Cílem práce proto bylo zjištění, zda by se látky mohly v praxi využít jako léčivá látka.

EXPERIMENT

Měřené veličiny:

- ❖ Teplota tání (bodotávek)
- ❖ Základní vlastnosti – barva, skupenství, ... (organoleptické posouzení)
- ❖ Čirost a stupeň opalescence kapalin (porovnání s rozpouštědlem určeným českým Lékopisem)

Tabulka č.1: Shrnutí zjištěných vlastností lidokainu

Metoda	Výsledek (+ ne/souhlasil s českým lékopisem)
Skupenství	Pevné (souhlasil)
Rozpustnost ve vodě	Ano (souhlasil)
Rozpustnost v 96% lihu	Ano (souhlasil)
Barva	Bílá (souhlasil)
Bod tání (zkoušky totožnosti)	73 °C – 76 °C (souhlasil)
Zkouška na čistotu (zkoušky totožnosti)	pH připraveného roztoku 2,8 (nesouhlasil)
Zkouška na chloridy (zkoušky totožnosti)	Připravená sraženina se rozpouštěla (souhlasil)

Tabulka č.2: Infračervená spektroskopie lidokainu

Skupina - vazba	Oblast vlnočtů	Intenzita pásu
N-H sekundární amin	3500	střední
C=C aromáty	1670-1450	střední
C=O amid	1650	silná
C-N	1030-1230	střední

- ❖ Stupeň zbarvení kapalin (porovnání s připravenými základními roztoky podle Českého lékopisu)
- ❖ Infračervená spektroskopie (ATR)

VÝSLEDKY A DISKUSE

V rámci této Středoškolské odborné činnosti byly studovány fyzikálně – chemické vlastnosti čtyři látky, které pozitivně působí na kardiovaskulární systém. U lidokainu, kyseliny acetylsalicylové, nifedipinu i propranololu byly stanoveny fyzikální a chemické vlastnosti.

U všech čtyř látek vždy nevyšlo jedno stanovení:

- ❖ Lidokain – zkouška čistoty
- ❖ Kyselina acetylsalicylová – stanovení obsahu
- ❖ Nifedipin – stanovení obsahu
- ❖ Propranolol – stanovení obsahu

Hlavním tématem této práce byl kardiovaskulární systém, teoretická část se tedy soustřeďuje na něj. V rámci praktické části byly u laboratorně připravených látek zkoumány fyzikální a chemické vlastnosti s cílem zjistit, zda jsou vhodné pro využití jako léčivá látka v praxi. Ani jedna ze čtyř připravených látek nesplňovala požadavky Českého lékopisu, tudíž nemohla být ani jedna využita..

ZÁVĚR

Tabulka č.5: Shrnutí zjištěných vlastností nifedipinu

Metoda	Výsledek (+ ne/souhlasil s českým lékopisem)
Skupenství	Pevné (souhlasil)
Rozpustnost ve vodě	Ano (souhlasil)
Rozpustnost v acetonu	Ano (souhlasil)
Rozpustnost v ethanolu	Ano (souhlasil)
Barva	Žlutá (souhlasil)
Bod tání (zkoušky totožnosti)	168 °C – 170 °C (souhlasil)
Zkouška na čistotu (zkoušky totožnosti)	Připravený roztok výrazně zčervenal (souhlasil)
Stanovení obsahu	Látka obsahovala 97,6% sloučeniny $C_{17}H_{18}N_2O_6$ (nesouhlasil)

Tabulka č.6: Shrnutí zjištěných vlastností propranololu

Metoda	Výsledek (+ ne/souhlasil s českým lékopisem)
Skupenství	Pevné (souhlasil)
Rozpustnost ve vodě	Ano (souhlasil)
Rozpustnost v 96% lihu	Ano (souhlasil)
Barva	Bílá (souhlasil)
Bod tání (zkoušky totožnosti)	164 °C – 167 °C (souhlasil)
Zkouška na chloridy (zkoušky totožnosti)	Připravená sraženina se rozpouštěla (souhlasil)
Vzhled roztoku (zkoušky čistoty)	Připravený roztok byl porovnáván s roztoky připravenými podle lékopisu (souhlasil)
Kysele a zásaditě reagující látky (zkoušky čistoty)	Připravený roztok zežloutl (souhlasil)
Stanovení obsahu	Látka obsahovala 98,5% sloučeniny $C_{16}H_{22}ClNO_2$ (nesouhlasil)

Tabulka č.4: Infračervená spektroskopie kyseliny acetylsalicylové

Skupina - vazba	Oblast vlnočtů	Intenzita pásu
-OH s H můstekem (alkohol)	3400-3200	silná (široký pás)
C=C aromáty	1670-1450	střední
C=O karboxylová kyselina	1710	silná
O=C-O- e ster	1300-1100	silná

Detekce pšeničných proteinů v masných výrobcích pomocí fluorescenční imunohistochemie



Martin Šotek

Střední průmyslová škola chemická Brno Vranovská 65



ÚVOD

Má odborná práce se zabývá detekcí gliadinových a gluteninových pšeničných proteinů v masných výrobcích běžně dostupných v maloobchodní síti. K detekci proteinů byla použita fluorescenční imunohistochemii, k pozorování vzorků byl použit fluorescenční mikroskop. Cílem práce bylo zjistit přítomnost pšeničných proteinů u šesti vzorků masných výrobků a jejich případnou zdravotní nezávadnost pro osoby alergické na lepek a celiaky. V rámci této odborné práce jsem se také zabýval souvislostí mezi přidáváním pšeničných bílkovin do masných výrobků a kvalitou těchto produktů. Praktickou část jsem prováděl na půdě Ústavu vegetabilních potravin fakulty veterinární hygieny a ekologie při VFU v Brně.

EXPERIMENT

Vzorky šesti masných výrobků byly zmrazeny a fixovány ke kovovému terčíku, aby bylo možné je nakrájet na sáňkovém mikrotomu. Po nakrájení na tloušťku $4\mu\text{m}$ byly řezy naneseny podložní sklíčka. Od každého vzorku byly připraveny tři takové preparáty. Aby bylo možné na vzorky nanést fluorescenční barvivo, musely být proteiny zviditelněny pro ně specifickými protilátkami (králičími). Nejprve však bylo nutné vzorky fixovat ledovým acetonom (-20), aby došlo k umrtvení všech buněk a zastavení všech biochemických dějů. Mezi ponořením do roztoku dané látky byly vzorky vždy stabilizovány v pufru PBS, aby došlo k vyrovnání pH. Před ponořením do roztoku primární protilátky byla nutná blokace nespecifické vazby pomocí Diulent normal séra, jinak by se primární protilátnka nemohla navázat na antigen. Při přípravě vzorků byla použita metoda nepřímého dvoustupňového imunoznačení, to znamená že kromě primární protilátky byla použita ještě protilátnka sekundární, která se na tu primární protilátku navázala jako na antigen. Tím bylo dosaženo větší citlivosti, než kdyby byla použita pouze primární protilátku. Po označení protilátkami byly vzorky obarveny fluorescenčním barvivem Fluorochrom Texas red a montovány montovacím médiem, které usnadňuje následné mikroskopování vzorku. Během pozorování fluorescenčním mikroskopem byla posuzována množství pšeničných bílkovin a jejich intenzita fluorescence ve vzorcích.

VÝSLEDKY A DISKUSE

U všech použitých masných výrobků bylo výrobcem deklarováno minimálně stopové množství pšenice. U pořízených snímků jde jasné vidět přítomnost pšeničného proteinu, protože vydává jasné světlo. Téměř u všech testovaných vzorků byla prokázána přítomnost pšenice, u jednoho vzorku byla jeho přítomnost nejistá. Pokud by tato potravina byla požita osobou alergickou na lepek nebo celiakem, mohla by vyvolat vážné zdravotní komplikace. Díky mému pozorování je patrné, že žádný z testovaných masných výrobků není vhodný pro osoby alergické na lepek nebo trpící celiakií. Podle současné legislativy se smí pšeničná bílkovina přidávat pouze do masných výrobků nižší jakosti jako náhrada čisté svalové bílkoviny. Testované vzorky do této kategorie spadaly také.

ZÁVĚR

Cílem mé práce bylo zjistit přítomnost přidaných pšeničných bílkovin ve vzorcích šesti masných výrobků dostupných v maloobchodech. Pro detekci byla použita nepřímá dvoustupňová fluorescenční imunohistochemická metoda. Pozorování bylo provedeno pod fluorescenčním mikroskopem. Výsledky ukázaly jasnou přítomnost pšeničných bílkovin ve všech testovaných masných výrobcích v minimálně stopovém množství. Všechny testované masné výrobky splnily deklaraci uvedenou výrobcem. Kvůli i potencionálnímu obsahu lepku by totiž mohlo být ohroženo zdraví alergiků nebo celiáků, kteří by danou potravu požili. Nahrazování čisté svalové bílkoviny pšeničnými proteiny prováděno hlavně z ekonomických důvodů u masných výrobků nižší jakosti. Má odborná práce tuto praktiku potvrzuje.

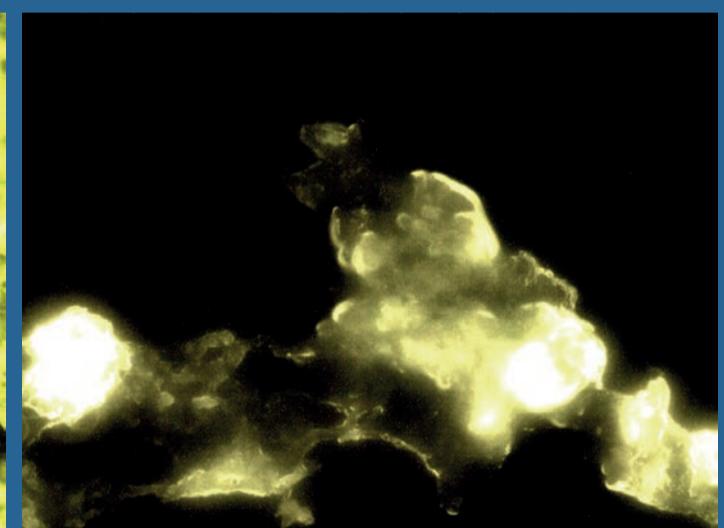
Masný výrobek	Deklarace výrobcem	Vzorek		
		A	B	C
Drůbeží sekaná (Interspar)	obsahuje pšeničné bílkoviny	+++	+++	++
Lahůdkový salám (Interspar)	stopy pšenice	++	+	++
Krůtí junior (Interspar)	stopy pšenice	++	+++	+++
Lahůdkové páry (Tesco stores ČR)	stopy pšenice	++	++	+++
Párky do rohlíku (COOP jednota Mikulov)	obsahuje pšeničný škrob	+	+/-	+
Jemné páry (Tesco stores ČR)	stopy pšenice	++	+++	+

Vysvětlivky: + až +++ síla intenzity fluorescence pšeničné bílkoviny, +/- dubiozný výsledek

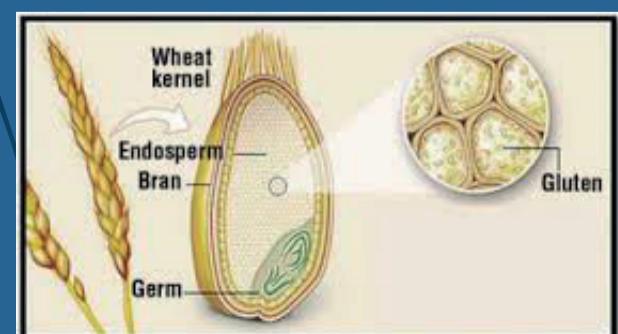
Obrázek č.1 Tabulka s výsledky pozorování



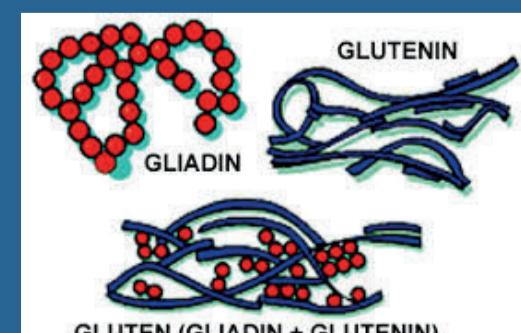
Obrázek č.2 Drůbeží sekaná (vzorek A)



Obrázek č.3 Lahůdkový salám (vzorek C)



Obrázek č.5 Uložení lepku v pšeničném zrnu



Obrázek č.6 Struktura molekuly lepku



Obrázek č.4 Krůtí Junior (Vzorek B)

Studium termodynamických a kinetických vlastností komplexotvornosti cyklodextrinů v léčivech

Jiří Martenek, Martin Zapletal

Střední průmyslová škola chemická Brno, Vranovská, příspěvková organizace
Vranovská 65, 614 00 Brno-Husovice, skola@spschbr.cz

ÚVOD

Tato práce se zabývá cyklodextriny a jejich využitím v potravinářském (stabilizátor E 459) a farmaceutickém průmyslu (adjuvans). Cykchodextriny jsou cyklické oligosacharidy, jejichž molekuly obsahují 6-8 α - D - glukopyranos. Hlavní výhodou cykchodextrinů je kavita tvaru dutého komolého kuželu, jenž vzniká vhodným prostorovým uspořádáním jednotlivých monosacharidů. Tato kavita umožňuje enkapsulaci hydrofilních látek (je to umožněno díky přítomnosti primárních hydroxilů, orientovaných do středu kavity) a právě tato jejich schopnost je využívána jak v průmyslu, tak i pro laboratorní účely. Díky tomu se stále provádí výzkumy, zaměřené na cykchodextriny a jejich komplexy, za účelem nalezení dalšího nového využití.

EXPERIMENT

Experiment se soustředuje na dvě oblasti – měření termodynamických vlastností a měření kinetických vlastností cykchodextrinových komplexů. V první z nich proběhlo měření absorbance světla různých vlnových délek.

- Termodynamické vlastnosti se zjišťovaly, pomocí titrace kyslého roztoku zásaditým, přičemž oba roztoky obsahovaly cykchodextrin o stejné koncentraci.

- Změna absorbance byla způsobena změnou barvy methylové oranže, jelikož se pH neustále měnilo.

- Výsledná absorbance však byla ovlivněna cykchodextrinem, který se s methylovou oranží komplexoval.

- Tímto způsobem byla zjištěna afinita různých druhů cykchodextrinů na barvivo.

- Na podobném principu se prováděli experimenty s léčivy.

- Měření bylo proveden i při stálém pH, kdy změna absorbance byla ovlivněna čistě cykchodextrinem (graf na obr. 3)

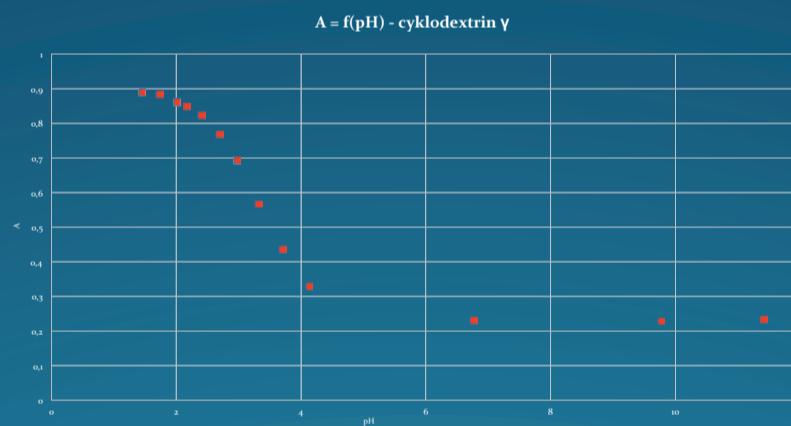
- Měření kinetických vlastností spočívalo ve změně absorbance za jednotku času.

- V květu proběhla reakce při které vznikalo barvivo p-nitrofenol.

- Přítomnost cykchodextrinu ovlivnila rychlosť vzniku tohoto barviva (absorbance se v čase neměnila tak rychle).

VÝSLEDKY A DISKUSE

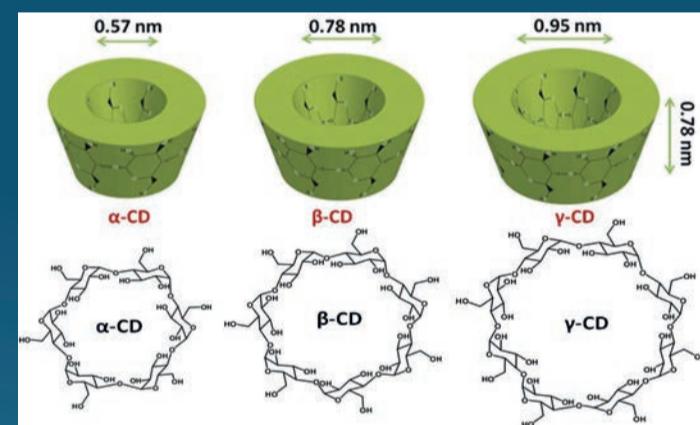
Z měření, která byla provedena s různými druhy cykchodextrinů v komplexech s barvivy, ale i léčivy, plyne, že tyto sloučeniny mohou zpomalovat ale i zrychlovat průběh mnoha reakcí, přičemž rozhodující vlastností je hydrofilita substrátů, které "zápasí" o místo v kavitě. Čím větší hydrofilita, tím větší afinita ke kavitě cykchodextrinu. V mnoha dražších léčivech již tyto látky našly uplatnění, neboť schopnost zpomalovat některé reakce zajíšťuje prodloužení terapeutického účinku léčiva (nefunguje u všech léčiv). Samotné cykchodextriny nemají žádné vedlejší účinky (jedná se pouze o oligosacharidy tvořené z glukosových jednotek). Mnoho dalších měření kinetických i termodynamických vlastností musí být ještě provedeno. Graf na obr. 2 je ukázka závislosti absorbance na pH zásaditého roztoku, který byl titrován kyselinou na barvivo methyloranž, přičemž v obou roztocích byl přítomen cykchodextrin o stejných koncentracích (nedocházelo k ředění a změny absorbance jsou způsobeny čistě změnou zbarvení indikátoru a cykchodextrinem).



Obr. 2: Graf závislosti absorbance na pH při acidimetrické titraci v přítomnosti cykchodextrinu.

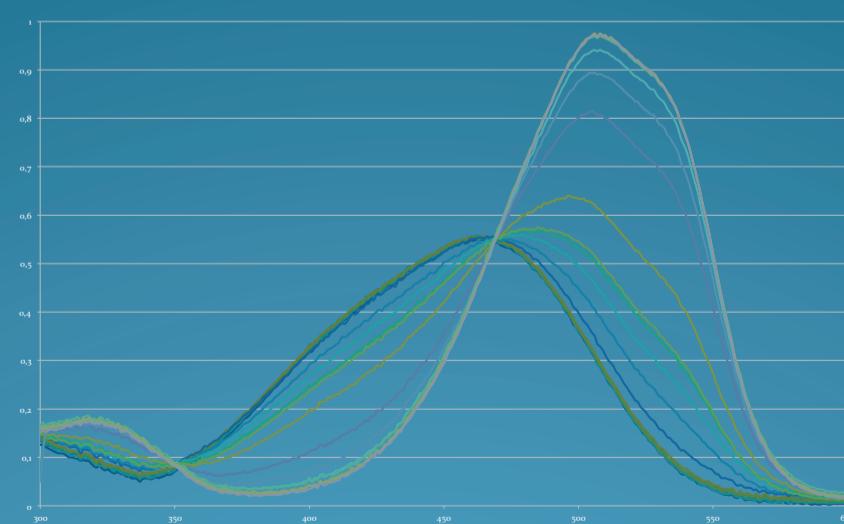
ZÁVĚR

Proběhla měření kinetických a termodynamických vlastností cykchodextrinů (cyklických oligosacharidů, schopných komplexace). Termodynamická měření spočívala ve změně absorbance barevného roztoku (barvivo methyl oranž) v důsledku komplexace s cykchodextrinem, zatímco kinetická měření tkvěla ve změně absorbance barviva za jednotku času. Z naměřených dat je možné zjistit rovnovážnou konstantu pro komplexační reakci i rychlostní konstantu. Z dosud provedených měření plyne, že afinita k cykchodextrinu roste s rostoucím hydrofylitou příslušného substrátu. Pro přesnou predikaci chování cykchodextrinů je nutno provést další měření a experimenty.



Obr. 1: Cykchodextriny a jejich prostorové uspořádání [1]

[1]HORSKÝ, Jiří a Jindřich JINDŘICH. Cykchodextriny ve světě polymerů. *Chemické listy*. 2013, **2013**(107): 8.



Obr. 3: Závislost absorbance methyloranžiena vlnové délce v přítomnosti cykchodextrinu a stálém pH 13.15.

STANOVENÍ RTUTI V RYBÍCH VÝROBCÍCH

Tomáš Pokorný¹, Petr Moric¹, Andrea Kleckerová², Pavel Kučera¹

¹ Střední průmyslová škola chemická Brno, Vranovská 65, 614 00, Brno

² Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00, Brno

andrea.kleckerova@mendelu.cz

ÚVOD

Tato práce se zabývá problematikou rtuti v rybích výrobcích. Stanovení obsahu rtuti ve všech složkách životního prostředí je stále aktuálním tématem. Kvůli jejím negativním vlastnostem, jako je například toxicita je velmi důležité monitorovat obsah této látky jak v životním prostředí, tak i v živých organismech. Pro člověka představují ryby důležitý zdroj některých látek, proto je důležitá jejich konzumace.

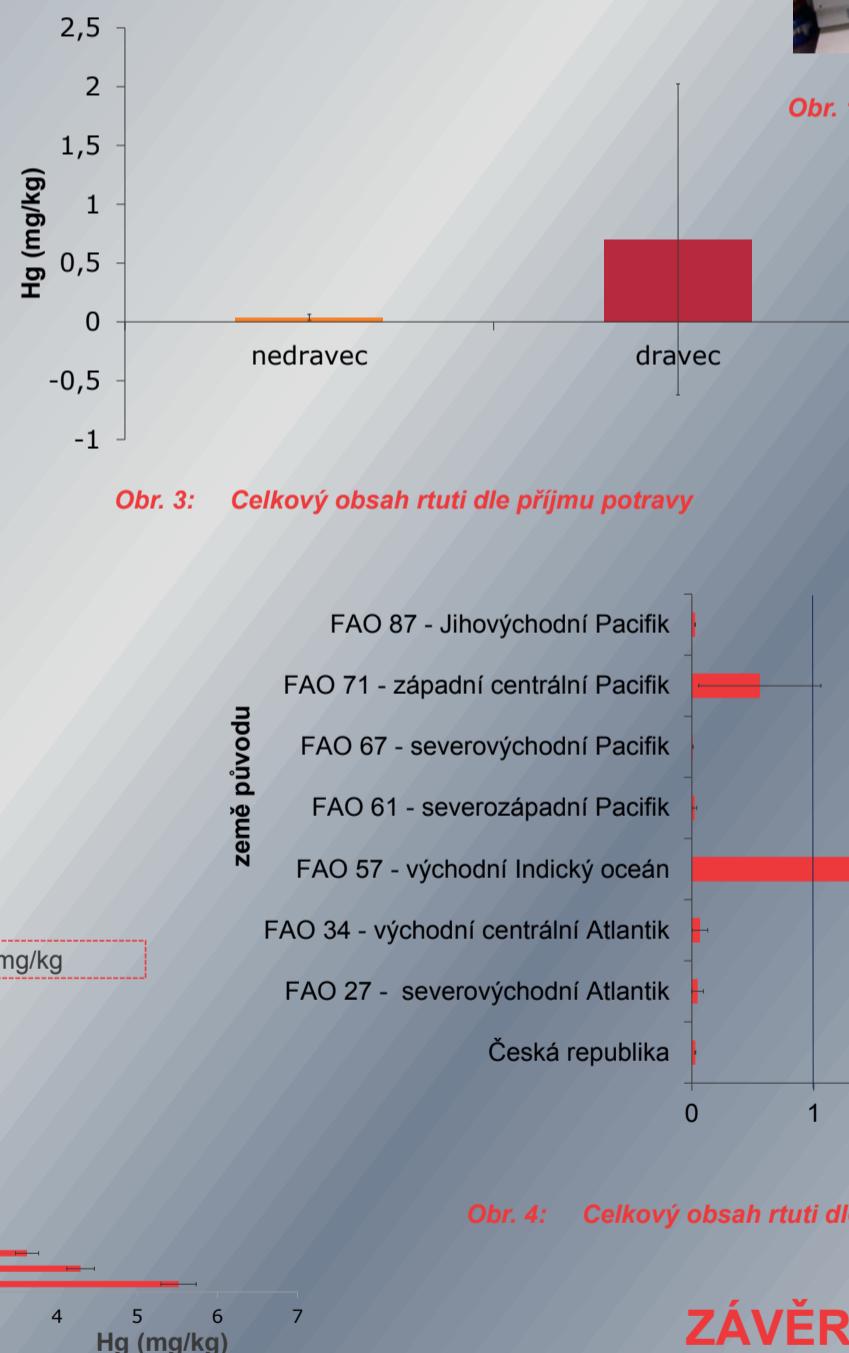
V teoretické části jsme se zabývali obecnými vlastnostmi rtuti, výskytem rtuti, haváriemi souvisejícími se rtutí, druhy měřených ryb a zpracováním ryb.

V praktické části jsme se zabývali odběrem vzorků, stanovováním celkového obsahu rtuti metodou AAS na přístroji AMA 254 a zpracováním výsledků.

VÝSLEDKY A DISKUSE

- koncentrace rtuti v analyzovaných vzorcích se pohybovala od 0,005 do 5 mg/kg čerstvého výrobku
- limit dle nařízení EU 1mg/kg
- 3 vzorky nadlimitní koncentrace
- zakoupeno několik kusů různých šarží

vzorek	popis
VARMUŽA	- treska na způsob lososa dracená
ALBERT	- tresčí játra
LÍŠNO	- pstruh
NEKTON	- losos kousky
ALMAR	- losos
GRAUT MARE	- Islandská tresční játra
NIXE	- sardinky v oleji
NIXE	- sardinky v tomatě
NAVEGAR	- sardelová očka s kapary
NOWACO	- sledové špuntíky
STARFISH	- uzený pstruh
NAVEGAR	- sardelové řezy v oleji
KLATOVY	- tolstolobik
NEKTON	- tresčí játra
KLATOVY	- kapr
SPAR	- šprotý
NAUTICA	- rybí pepřenky
NAUTICA	- pstruh
VARMUŽA	- Jemné sledové filety
TESCO	- filety z makrely v koř. rostlinném oleji
NOWACO	- matjesové řezy ala losos
LÍŠNO	- šprotý
RYBEX	- zavináče
SAIRA	- sardinka ve vlastní šťávě
VARMUŽA	- makrela uzená
PETRI	- sled'
Sendvičový tuňák ve vlastní šťávě	
ALBERT QUALITY	- tuňák ve vlastní šťávě
FRANZ JOSEF	- tuňákové filety
Uzený tuňák - DELIMAX, CZ	
VARMUŽA	- tuňák, CZ
VARMUŽA	- tuňák, CZ
Tuňák uzený, Principesca, plátky	
Uzený marlín indopacifický, Principesca, plátky	
Uzený marlín indopacifický, Principesca, plátky	



Obr. 2: Celkový obsah rtuti ve vybraných vzorcích

EXPERIMENT

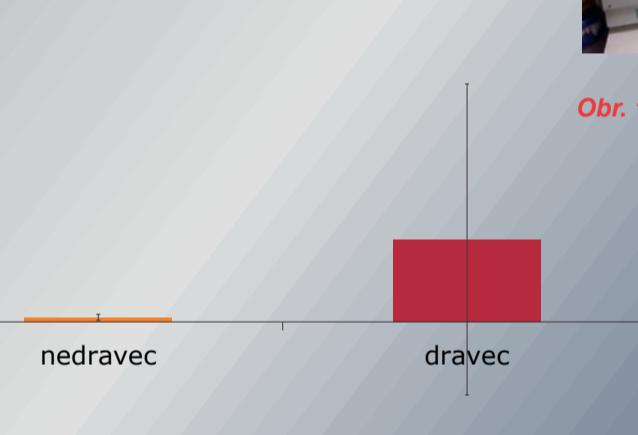
Pro experiment jsme zakoupili celkem 69 vzorků rybích výrobků. Byly pořízeny v českých supermarketech, a to v prodejnách Tesco, Billa, Albert, Spar a Lidl. Vzorky pocházely z 15 zemí světa a 8 lokalit FAO.

Po nakoupení byly výrobky převezeny do laboratoří na pracoviště Ústavu chemie a biochemie Mendelovy univerzity v Brně, kde byla provedena identifikace a fotodokumentace vzorků. Výrobky byly uchovávány při teplotě -20°C. Každý vzorek byl měřen třikrát a následně byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Průměry jsme poté použili jako vstupní hodnoty pro grafy a tabulky.

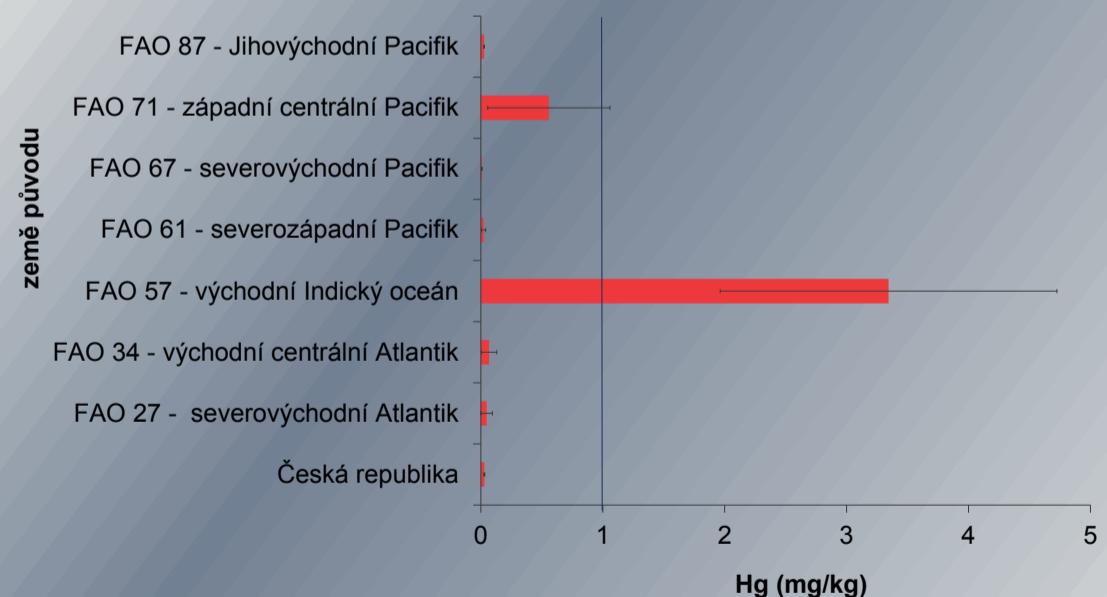
Pro stanovení obsahu rtuti jsme používali jednoúčelový atomový absorpční spektrometr AMA 254 (Obr. 1).



Obr. 1: AMA 254



Obr. 3: Celkový obsah rtuti dle příjmu potravy



Obr. 4: Celkový obsah rtuti dle země původu

ZÁVĚR

- 3 vzorky nevyhovovaly limitům dle nařízení EU č. 1881/2006 a 420/2011: 1 mg Hg/kg

- uzený marlín a uzený tuňák firmy Principesca (Itálie) staženy z trhu

- nařízena nápravná opatření dle SZPI a SVS

Hodnocení kvality léčiv pomocí metod HPLC a TLC

Štěpánka Ríkanová

Střední průmyslová škola chemická Brno, Vranovská 65

rikanovastepa@gmail.com

ÚVOD

V mojí středoškolské odborné činnosti jsem se zabývala hodnocením obsahu nečistoty v léčivech pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a chromatografie na tenké vrstvě.

Sledovanými látkami byly paracetamol, lidokain a kyselina acetylsalicylová. Tyto látky jsou běžně užívaná léčiva.

Mým úkolem bylo zjistit kvalitu syntetizovaného vzorku a porovnat jej se standardem, případně charakterizovat přítomné nečistoty.

Toto téma jsem si vybrala, jelikož mě zaujala jeho náplň a především práce s technikou, ke které se běžně nedostanu.

EXPERIMENT

Mobilní fáze TLC

- Kyselina acetylsalicylová
32,5 ml hexanu, 15 ml ethylacetátu a 1 ml kyseliny octové
- Paracetamol
8 ml metanolu, 30 ml chloroformu a 2 ml kyseliny octové
- Lidokain
8 ml metanolu, 30 ml chloroformu a 2 ml kyseliny octové

Mobilní fáze HPLC

- Mobilní fáze byla pro všechny vzorky stejná
- směs pufu a acetonitrilu v poměru 85:15
- Pufr připraven z 0,788 g mravenčanu amonného a 475 ml destilované vody

Analýza TLC

- Mobilní fáze nalita do vyvíjecí komory
- Do vaničky umístěna silufolová deska s nanesenými vzorky
- Vyvíjení
- Umístění chromatogramu pod UV lampu
- Zaznamenání skvrn

Analýza HPLC

- Nástrčí standardů a analytu
- Putování vzorků kolonou při teplotě 30°C a při průtoku mobilní fáze 0,2 ml za minutu
- Detekce při vlnových délkách 202 nm (ASA), 246 nm (PARA), 210 nm (LIDO)

ZÁVĚR

V mojí práci jsem se zabývala hodnocením léčiv pomocí metod HPLC a TLC. Sledovala jsem kvalitu zhotovených léčiv a to paracetamolu, lidokainu a kyseliny acetylsalicylové.

Během měření jsem zjistila, že metoda TLC nezaznamenala žádné nečistoty na chromatogramu kyseliny acetylsalicylové, paracetamolu ani lidokainu.

Metoda HPLC však odhalila nečistoty u kyseliny acetylsalicylové. Nečistota byla identifikována jako kyselina salicylová. U lidokainu a lidokainu z mikrovlnného reaktoru byly také detekovány nečistoty viz tab. č. 11 a tab. č. 12.

U paracetamolu se nevyskytovala žádná nečistota.

Mezi moje hlavní cíle patřilo porovnání účinnosti metod HPLC a TLC z několika hledisek: přesnost, dostupnost, finanční zátěž a složitost těchto metod.

Jednoznačně přesnější je metoda HPLC, která je také méně časově náročná, ale výrazně dražší.

Metoda TLC je tedy spíše pro orientaci. Je však snadněji a o mnoho levnější.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky -kyselina acetylsalicylová

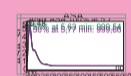
TLC



- Obr. č. 1: Chromatogram vzorku pod UV lampou
- Tab. č. 1: Retenční faktory srovnávaných látek

	Standard	Vzorek	Nečistota
Vzdálenost (cm)	2,4	2,8	3,5
R _f (cm)	0,34	0,40	0,50

HPLC



- Obr. č. 2: Spektrum standardu kyseliny acetylsalicylové
- Tab. č. 2: Výsledky retenčních časů standardů analytu a nečistoty

	tR (min)	SD (min)	RSD (%)
Kyselina acetylsalicylová	5,6965	0,0035	0,061
Kyselina salicylová	6,2580	0,0050	0,079

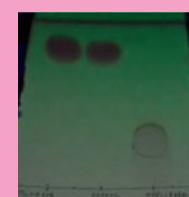


- Obr. č. 3: Chromatogram vzorku kyseliny acetylsalicylové
- Tab. č. 3: Výsledky vzorku kyseliny acetylsalicylové

	tR (min)	SD	RSD (%)
Kyselina acetylsalicylová	5,682	0,005	0,087
Kyselina salicylová	6,266	0,014	0,215

Výsledky-paracetamol

TLC



- Obr. č. 4: Chromatogram vzorku pod UV lampou
- Tab. č. 4: Retenční faktory srovnávaných látek

	Standard	Analyt	Nečistota
Vzdálenost (cm)	6,9	6,6	2,5
R _f (cm)	0,87	0,84	0,32

HPLC



- Obr. č. 5: Spektrum standardu paracetamolu
- Tab. č. 5: Výsledky retenčního času standardu a nečistoty

	tR (min)	SD	RSD (%)
Paracetamol	8,4915	0,0015	0,0176
4-aminofenol	2,6270	n	n



- Obr. č. 6: Chromatogram vzorku paracetamolu
- Tab. č. 6: Výsledky vzorku paracetamolu

	tR (min)	SD	RSD (%)
Paracetamol	8,4865	0,0035	0,0413
4-aminofenol	ND	n	n

Výsledky-lidokain

TLC



- Obr. č. 7: Chromatogram analytu pod UV lampou
- Obr. č. 7: Retenční časy srovnávaných látek

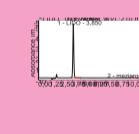
	Standard	Analyt	Analyt 2
Vzdálenost (cm)	3,1	3,3	3,3
R _f (cm)	0,34	0,36	0,36

HPLC



- Obr. č. 8: Spektrum standardu lidokainu
- Tab. č. 8: Výsledky retenčního času standardu a nečistoty

	tR (min)	SD	RSD (%)
Lidokain	3,8385	0,0015	0,0391
2-chlor-N-(2,6-dimethyl-fenyl)-acetamid	10,4170	0,0400	0,3839



- Obr. č. 9: Chromatogram vzorku lidokainu
- Tab. č. 9: Výsledky vzorku lidokainu

	tR (min)	SD	RSD (%)
lidokain	3,8465	0,0035	0,0909
meziprod ukt	10,4150	0,0320	0,3072

Stanovení antioxidační aktivity vybraných ovocných šťáv v závislosti na tepelné úpravě

Tereza Polanská

Gymnázium Brno-Řečkovice, Terezy Novákové 2, 621 00

ÚVOD

Antioxidanty jsou látky, které jsou syntetizovány, popřípadě získávány z prostředí aerobními organismy. Slouží jako obrana proti poškození atomárním kyslíkem, jež je běžně přítomen v atmosféře, či jinými volnými radikály vznikajícími v tělech těchto organismů. Lidé přijímají antioxidanty prostřednictvím potravy, velmi významnou skupinou zdrojů je ovoce. Tento výzkum se zabývá obsahem vitaminu C, fenolických látek a celkovou antioxidační aktivitou tří vzorků čeledi růžovitých a tří vzorků čeledi routovitých (citrusů) začerstva a po tepelné úpravě.

EXPERIMENT

1) Stanovení obsahu vitaminu C - titrace

- titrační standard – roztok jodu ($c=5 \text{ mmol/l}$ pro citrusy a $c=0,5 \text{ mmol/l}$ pro růžovité)
- titr – vzorek (10 ml pro routovité, 50 ml pro růžovité), 2 ml 10% H_2SO_4 , 50 ml H_2O
- indikátor – 1 ml škrobového mazu
- standard - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($c=0,01 \text{ mol/l}$)

rovnice standardizace:



rovnice titrace:



Každý vzorek byl titrován celkem třikrát, následně byl vypočítán obsah vitaminu C ve šťávě pomocí následujícího vzorce:

$$m = c(\text{I}_2) * v(\text{I}_2) * 176$$

(176 g/mol je molární hmotnost vitaminu C)

2) Fotometrické stanovení obsahu fenolů

Do jedné zkumavky byly napippetovány následující látky:

- 2 ml NaHCO_3
- 0,5 ml FCR (Folin-Ciocalteu reagent)
- 0,25 ml (růžovité kromě blumy), 0,2 ml (citrusy) nebo 0,05 ml (blumy) vzorku doplněného vodou na 3 ml

Do druhé zkumavky byla místo FCR přidána voda (slepý vzorek = blank).

FCR reagovalo s fenolickými látkami přítomnými v ovocné šťávě za vzniku zabarvení. Reakce byla urychlena vložením zkumavky do vodní lázně ($T=75^\circ\text{C}$) po dobu 1 minuty.

Pomocí spektrofotometru Helios byl měřen rozdíl absorbance ovocné šťávy a blanku při 650 nm.

S využitím roztoku pyrokatecholu (benzen-1,2-diol; 0,1; 0,2; 0,3 a 0,4 mg/ml) byla vytvořena kalibrační křivka.

Výsledná hodnota absorbance byla přepončtena na molární koncentraci pyrokatecholu (na základě rovnice dané kalibrační křivkou).

3) Stanovení celkové antioxidační aktivity (TAA)

- 2 ml činidla (příprava - 2 ml roztoku ABTS $c=7 \text{ mmol/l}$ + 2 ml roztoku $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ $c=2,45 \text{ mmol/l}$, vzniklý roztok smíchán s fosfátovým pufrem v poměru asi 1:50)
- vzorek (0,01 ml růžovité, 0,005 ml citrusy)

Pomocí spektrofotometru Helios byl měřen rozdíl absorbance vzorku (po pěti minutách od smíchání) a blanku (samotné činidlo) při 734 nm.

Reakcí ABTS⁺ s antioxidanty přítomnými v ovocné šťávě se vzorek odbarvoval.

Byla vytvořena kalibrační křivka a hodnoty byly přepončteny na molární koncentraci pyrokatecholu.

3) Celková antioxidační aktivity

vzorek	čerstvý	vařený	rozdíl
jablko	1,25	1,54	0,30
hruška	1,04	1,11	0,07
bluma	3,65	2,88	-0,77
pomeranč	8,19	11,11	2,92
citron	7,99	12,53	4,54
mandarinka	8,23	10,21	1,98

Tab. 3: Celková antioxidační aktivity ovocných šťáv

(hodnoty jsou uváděny v mmol/l pyrokatecholu)

- kromě blumy se u všech vzorků zvýšila celková antioxidační aktivity po tepelné úpravě
- šťávy z citrusů mají podstatně vyšší celkovou antioxidační aktivitu než šťávy z růžovitých

VÝSLEDKY A DISKUSE

růžovité - jablko, hruška, bluma

routovité - pomeranč, citron, mandarinka

Všechny druhy ovoce byly zakoupeny v obchodním řetězci Globus, odšťavněny a šťáva byla zfiltrována. tepelná úprava – vodní lázeň ($T=75^\circ\text{C}$), 25 minut

1) Obsah vitaminu C

vzorek	čerstvý	vařený	rozdíl	úbytek
jablko	11,99	11,42	-0,57	4,76%
hruška	7,80	7,42	-0,38	4,87%
bluma	16,74	15,79	-0,95	5,69%
pomeranč	551,72	504,22	-47,51	8,61%
citron	437,62	399,57	-38,05	8,70%
mandarinka	485,19	437,62	-47,57	9,80%

Tab. 1: Obsah vitaminu C v ovocných šťávách

(hodnoty jsou uváděny v mg/l)

- šťávy z růžovitých druhů mají daleko menší množství vitaminu C
- tepelnou úpravou dochází ke ztrátám na vitaminu C v rozmezí 4-10 %

2) Obsah fenolů

vzorek	čerstvý	vařený	rozdíl
jablko	1,70	1,91	0,21
hruška	1,35	1,50	0,15
bluma	4,34	3,22	-1,13
pomeranč	2,67	2,78	0,11
citron	2,22	2,55	0,33
mandarinka	2,55	2,71	0,16

Tab. 2: Obsah fenolů v ovocných šťávách

(hodnoty jsou uváděny v mmol/l pyrokatecholu)

- kromě blumy mají fenoly vyšší koncentraci po tepelné úpravě
- bluma má nejvyšší koncentraci fenolů ze všech vzorků

Vzorky byly před měřením filtrovány (kvůli fotometrickému stanovení), některé hodnoty se mohou od nefiltrovaných lišit. Například při titraci nefiltrované pomerančové šťávy bylo naměřeno asi o 14 % více vitaminu C než u filtrované.

Ve šťávách z citrusů je daleko více vitaminu C, což může být mimojiné způsobeno filtrací či samotným způsobem odštávnění. Dle některých zdrojů obsahují jablka kolem 10 mg vitaminu C na 100 g. Výsledky titrace ukázaly, že ve filtrované jablečné šťávě odpovídá 10 mg vitaminu C asi 830 ml.

Po zahřátí ve vodní lázni po dobu 25 minut došlo k úbytku množství vitaminu C ve šťávách. Zároveň se však zvýšil obsah fenolů a celková antioxidační aktivity (kromě šťávy z blum). To mohlo být způsobeno odštěpením struktur, které byly před zahřátím navázány na hydroxylových skupinách. Tato domněnka však zatím nebyla potvrzena.

ZÁVĚR

- úbytek vitaminu C po tepelné úpravě (4-10 %)
- vyšší obsah vitaminu C ve šťávách z citrusů, vyšší TAA
- bluma má více vitaminu C i vyšší TAA než ostatní růžovité
- po 25 minutách tepelné úpravy zvýšení obsahu fenolů a TAA u všech kromě blumy
- bluma obsahuje nejvíce fenolů

Prostup biologicky aktivních látek přes membrány simulační lidskou kůží

Autor Tomáš Gazárek¹
Školitel Ing. Jiří Smilek²
Školitel specialistka Ing. Marcela Laštúvková²
Konzultant Mgr. Radek Matuška¹

¹ Střední průmyslová škola chemická Brno
Vranovská 65, 614 00 Brno, Česká republika
² Vysoké učení technické v Brně, Fakulta
chemická
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Česká
republika



Úvod

Kůže tvoří ultimátní bariéru mezi lidským tělem a okolním prostředím a tím ho chrání před biologickými, mechanickými, fyzikálními a chemickými vlivy. Je semipermeabilní (polopropustná), což může lidskému tělu škodit např. propouštěním chemických polutantů, ale také prospívat. Studium semipermeability kůže je hlavním předmětem tohoto výzkumu. Konkrétně se zabývá srovnáním penetračních vlastností a s tím spojených analgetických účinků vybraných, komerčně zakoupených gelů.

Pro srovnání byly vybrány 3 gely různých výrobců s různými účinnými látkami – Voltaren® Emulgel®, Ibalgin® GEL a Aulin® gel. Penetrační vlastnosti gelů byly testovány v temperovaných Franzových difúzních celách, kdy difundovaly skrze vepřovou kůži do fyziologického roztoku, odkud byla jejich koncentrace stanovena za pomocí UV-VIS spektroskopie. Tímto způsobem je možné na základě penetračních vlastností daného gelu odvodit rychlosť nástupu jeho účinku.



Obr. 1: Srovnávané gely.

Experiment

Nejprve byly připraveny a proměřeny koncentrační řady všech gelů v různých koncentracích a z nich byla vytvořena kalibrační křivka pro následné zjišťování koncentrace gelu ve fyziologickém roztoku, do kterého gel skrze kůži difundoval.

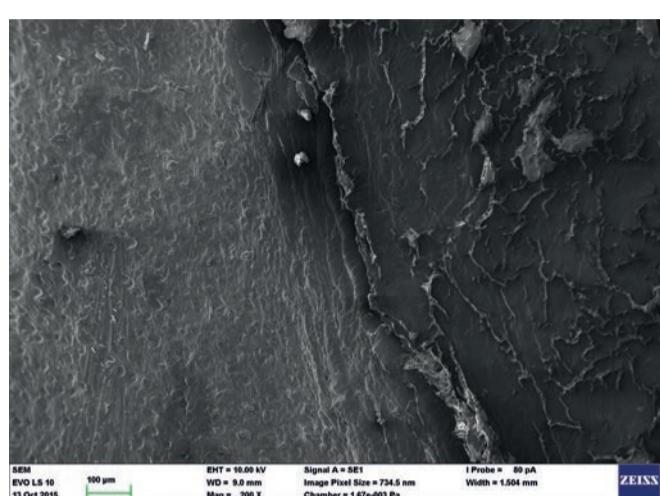
Vepřová kůže byla získána jejich opatrým oddělením za pomocí skalpelu od čerstvého vepřového ucha.



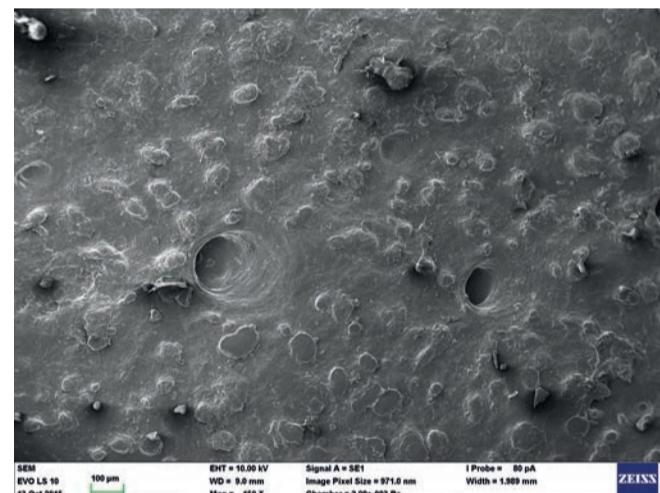
Obr. 2: Kůže oddělená skalpelem z vepřového ucha.

Malé množství kůže bylo odděleno, vysušeno a změřeno pomocí SEM (skenovací elektronový mikroskop).

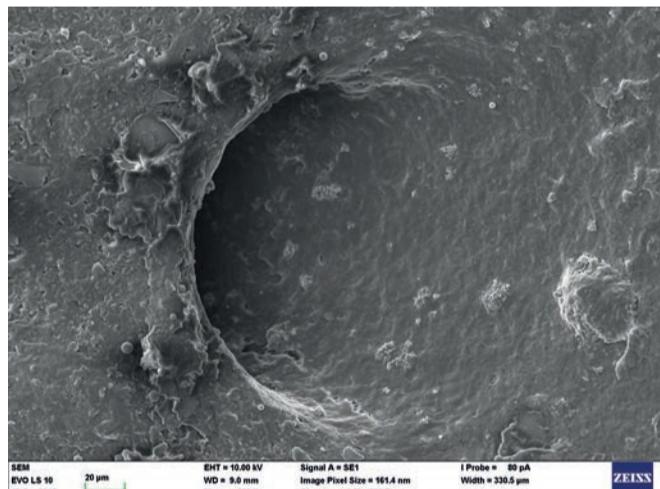
Byla sestavena aparatura složená z Franzových difúzních cel, termostatu nastaveného na teplotu lidského těla tj. 36,5 °C, jako membrány difúzních cel byly použity jak syntetické membrány, tak i vepřová kůže. Každých 15 min u každé difúzní cely proveden odběr vzorku a jeho následné měření na UV-VIS. Před začátkem experimentu, respektive po jeho ukončení byla měřena velikost částic zkoumaných gelů pomocí dynamického rozptylu světla. Experiment byl opakován dvakrát, aby byla zjištěna jeho reproducibilnost a správnost.



Obr. 3: Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu: průřez vepřovou kůži – levá polovina je pokožka, pravá polovina je škára.



Obr. 4: Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu: pokožka vepřové kůže.



Obr. 5: Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu: detail póru.



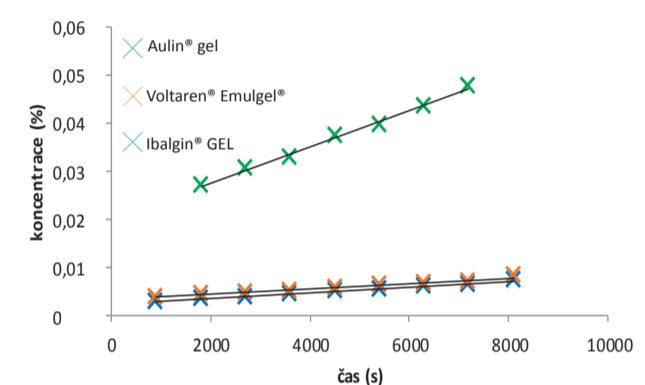
Obr. 6: Temperovaná difúzní aparatura.

Výsledky a diskuze

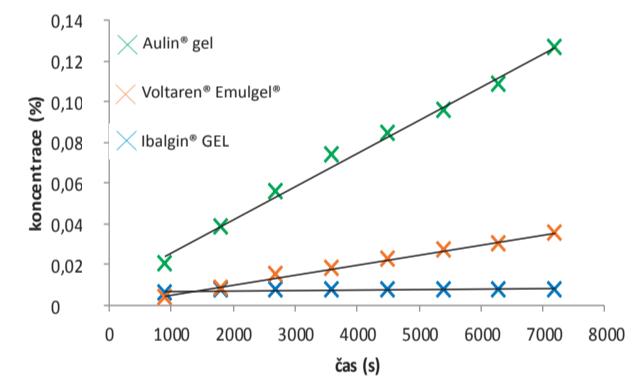
Jak je patrné z grafů na obr. 7 a 8 nejlepší penetrační vlastnosti má Aulin® gel, Voltaren® Emulgel® má penetrační vlastnosti podstatně horší, nejhůře dopadl Ibalgin® GEL.

V grafu na obr. 9 jsou nejlépe viditelné rozdíly v penetračních schopnostech jednotlivých gelů.

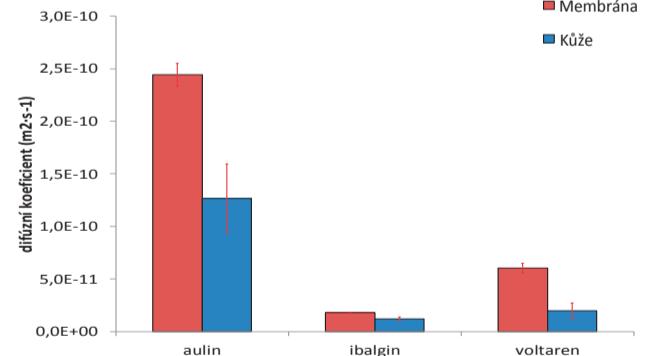
Difúzní koeficient je úměrnost mezi difúzním tokem a koncentračním gradientem. Číselně je roven látkovému množství difundující složky, která projde za jednotkovou plochu za jednotku času při jednotkovém koncentračním gradientu.



Obr. 7: Graf penetrace přes kůži při T= 36,5 °C.



Obr. 8: Graf penetrace přes syntetickou membránu při T=36,5 °C.



Obr. 9: Graf difúzních koeficientů.

Závěr

Trend difúze, co se srovnávaných gelů týče, je stejný pro syntetickou membránu i pro membránu z vepřové kůže. U syntetické membrány a u kůže se liší pouze celkové množství penetrované látky. Z výsledků je patrné, že nejrychlejší a i nejsilnější účinek se dostaví u Aulin® gel, dále u Voltaren® Emulgel® a nejpozději a nejméně u Ibalgin® GEL.



Jihomoravský kraj

Tato práce byla provedena za finanční podpory Jihomoravského kraje.



Analýza vybraných buněčných markerů u primárních buněčných linií spinocelulárních karcinomů v oblasti hlavy a krku

Marek Feith

Luboš Holý, Michal Masařík

Střední průmyslová škola chemická, Brno, Vranovská 65

Kontakt: mafeith@seznam.cz

Spinocelulární karcinomy v oblasti hlavy a krku (HNSCC) jsou v incidenci nádorů celosvětově na šestém místě (viz ADAM, Zdeněk a Jiří VORLÍČEK. Speciální onkologie. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2002, 542 s. ISBN 80-210-2826-2.). Včasnost diagnózy je kritickým faktorem, který často ovlivňuje přežití pacientů. K rčení diagnózy mohou sloužit mimo jiné i markery.

Cílem této studie bylo analyzovat markery (EGFR, MMP-2, MT) v krevní plasmě a primárních buněčných liniích pacientů s HNSCC na proteinové i RNA úrovni. Krevní plasma byla analyzována metodou ELISA. Pro stanovování markerů v primárních buněčných liniích bylo použito qRT-PCR. Pro statistické analýzy byla použita jednofaktorová analýza rozptylu následovaná plánovanými porovnáními. Hladina významnosti $p < 0,05$ byla považována za signifikantní. Byl použit software Statistica 12 (StatSoft, Tulsa, CA, USA).

Koncentrace EGFR v krevní plasmě pacientů s HNSCC je signifikantně vyšší ($p = 0,0219$), než u zdravých kontrol, čímž se může zvyšovat angiogeneze lokálního tumoru i možnost tvorby metastáz. Hladina MT byla měřena v závislosti na zasažení lymfatických uzlin a u lokalizovaných a diseminujících nádorů. Pacienti se zasažením lymfatických uzlin mají signifikantně vyšší koncentraci MT. Zjištění změn exprese MT během léčby by mohlo vést k lepšímu odhadu prognózy nádoru. Hodnoty koncentrace MT v krevní plasmě u lokalizovaných nádorů byly signifikantně vyšší, než u diseminujících. V důsledku vysoké heterogenity nádorové tkáně se subpopulace z primárních buněčných linií významně lišily expresí genů. Gen pro MT-2 byl více exprimován v subpopulaci fibroblastů asociovaných s nádory a v nádorových buňkách, což potvrzuje význam tohoto kov-vázajícího antioxidačního proteinu v patogenezi HNSCC.

Jako potencionálně vhodné markery pro určování diagnózy spinocelulárních karcinomů v oblasti hlavy a krku se jeví EGFR a MT.

Tato práce byla vypracována za finanční podpory Jihomoravského centra pro mezinárodní mobilitu (JCMM) a Jihomoravského kraje (JMK).

Autor nedodal svůj příspěvek do uzávěrky sborníku.

*Sekce studentů bakalářských a magisterských
studijních programů*

Tématický okruh organická, enviromentální a biochemie

Diversity of *Haematococcus pluvialis* strains

Dana Byrtusová, Ing. Radka Kočí, Ph.D., prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Food Science and Biotechnology
Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic
xcbbyrtusova@fch.vutbr.cz

PSI (Photon Systems Instruments), spol. s.r.o.
Drasov 470, 664 24 Drasov, Czech Republic

1 Introduction

Microalgal organisms are an attractive resource highly used to production of various bioactive compounds such as unsaturated fatty acids, proteins, carotenoids and other. Astaxanthin is reddish keto-carotenoid with high antioxidant properties. He was found as secondary metabolite in *Haematococcus pluvialis*^{1,2}, a unicellular green alga conciderent as the most potent producer of this pigment, accumulating even 4 % of its dry weight under unfavorable environmental conditions (high solar irradiance or low nutrient availability). *Haematococcus pluvialis* has a very unique life cycle, with four cell stages: vegetative cell growth, encystment, maturation and germination^{3,4}. The production of astaxanthin starts with the morphological change from motile green vegetative cells towards red cysts. For each stage the optimal environmental and nutritional conditions are quite different⁵.

Industrial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* focused on a two-step process. First, vegetative cells are produced under controlled conditions. After sufficient growth the culture is exposed to stress with the aim to accelerate accumulation of astaxanthin. In commercial production, it is often applied a lack of nitrogen, increasing the temperature and light or addition of sodium chloride to the media^{6,7}.

The *Haematococcus* is cosmopolitan, reported from all continents. In recent years, several new strains of HMP with interesting properties were isolated as strain, which can grow and produce astaxanthin at low temperatures, or Arctic strain with elevated salt tolerance^{8,9}. The location of occurrence of different strains of *Haematococcus* related to optimal growth conditions, such as pH, temperature or light. During the cultivation is also necessary to provide sufficient nutrients by selecting the appropriate media. The most widely used media are BG11 or BBM and temperature range 25–28 °C. In studies investigating the pH is the best choice pH 7¹⁰.

2 Experimental

2.1 Algal strains, cultivation and medium composition

The strains of *Haematococcus pluvialis* (HMP) used in presented study were obtained from german collection EPSAG (SAG 34-1d – strain from Switzerland, SAG 49.94 – strain from USA, SAG 44.96 – strain from Africa, SAG-192.80 – strain from Germany). Inoculum was grown photoautotrophically in BG11-medium (*Table 1*) at 25 °C. Experiments with different growth media (*Table 1*) were conducted in photobioreactor Multi-Cultivator MC 1000 – OD (PSI) with 8 independently illuminated vessels (100 µmol photons.m⁻².s⁻²) and under controlled temperature (22°C). Each vessel was bubbled with the air enriched by 2 % of CO₂. The growth of cultivated strains was monitoring by periodically measuring of optical density at two wavelengths (680 nm, 720 nm). The data was transferred to PC computer from the Multi-Cultivator internal memory. Moreover the growth of culture and cell viability were controlled by handly measuring of optical density (680 nm, 720 nm) and quantum yield (QY) using the pocket size instrument AquaPen (PSI).

Table 1: Composition of the different growth media used (g/L).

Content	Media		
	BG11	BG11+	BBM
NaNO ₃	149,6	149,6	25
MgSO ₄ .7H ₂ O	7,48	7,48	7,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,6	3,6	2,5
Citric acid	0,6	0,6	
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	0,123	0,123	
Ferric ammonium citrate	6	60	
Na ₂ CO ₃	20	20	
NaCl			2,5
K ₂ HPO ₄	30,5	305	7,5
KH ₂ PO ₄			17,5
Komplexon III EDTA			50
FeSO ₄ .7H ₂ O			5
H ₃ BO ₃	2,86	2,86	11,42
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22	2,2	8,82
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81	1,81	1,44
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,39	0,39	2,42
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079	0,079	1,57
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,049	0,049	0,49

2.2 Growth phases and number of cells

Growth phases and number of cells were determinated by optical microscope under enlarge 10x100. For calculation of cell number algal cells were fixed with Lugol's solution analyzed by Bürker chamber.

2.3 Calculation of doubling time

The doubling time is the period of time required for a quantity to double in population growth. It was calculated from growth rate (μ) following the equations (1), where OD_1 and OD_2 are optical densities at time t_1 and t_2 . The doubling time (DT) of alga cells was calculated according to the formula (2).

$$\mu = \frac{\ln OD_2 - \ln OD_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

$$D = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2)$$

2.4 Total nitrogen analysis (TN)

The relationship between the growth of cells and nitrogen content in cultivation environment was studied. Consumption of nitrogen was determined as concentration of total nitrogen in medium during the cultivation of HMP. The samples of algal suspension were taken in several intervals and centrifuged at 5000 rpm for 10 min, 5 ml of supernatant were diluted with distilled water to final volume 15 ml. The prepared sample was analyzed using TOC/TN analyzer (TOC-VCSH & TNM-1, Shimadzu Scientific Instruments).

2.5 ICP-MS analysis of elements

Due to the different original locality of used HMP strains the nutrient demands for algal growth were observed. Residual nutrients were analysed as the element concentration on medium during HMP cultivation. 2 ml of algal suspension were taken in several intervals and filtered using 2 μ m aqua filters. The supernatant was diluted 10 times by 3% HNO_3 and analysed using ICP/MS instrument (Agilent).

3 Results

3.1 Algal strains cultivation

HMP growth characteristics were determined using 3 different cultivation media. BBM and BG11 are widely used media for algal and/or cyanobacterial cultivations. BG11+ is the medium optimized for native Czech strain of HMP. Showed results of growth parameters were obtained using AquaPen (PSI).

Figure 1 shows the growth of the strains of HMP in BG11 medium, measured by optical density (OD) at 680 nm. The best growth exhibit the strain from Switzerland with maximum OD under 0.8, the lowest growth shows the African strain when the growth not exceeded 0.2.

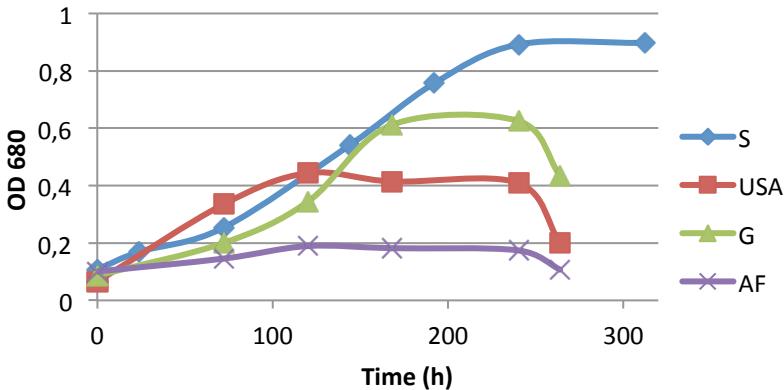


Figure 1: OD₆₈₀ in BG11 medium.

Figure 2 shows the cultivation in BBM medium. The highest OD₆₈₀ was measured at strain from Switzerland, while the growth of African strain was very low.

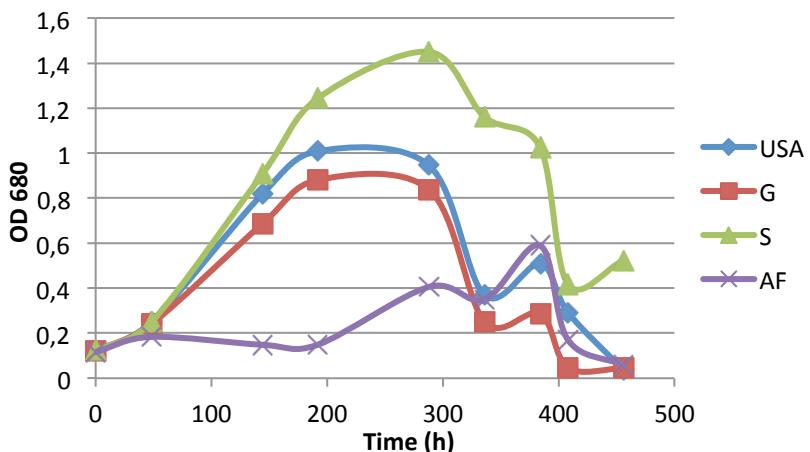


Figure 2: OD₆₈₀ in BBM medium.

The cultivation in medium with 10 times higher concentration of chosen elements (BG11+) is showed in Figure 3. The strain from Switzerland demonstrate the largest rise of optical density. German and African strains had similar growth, but maxima of OD are located at various time.

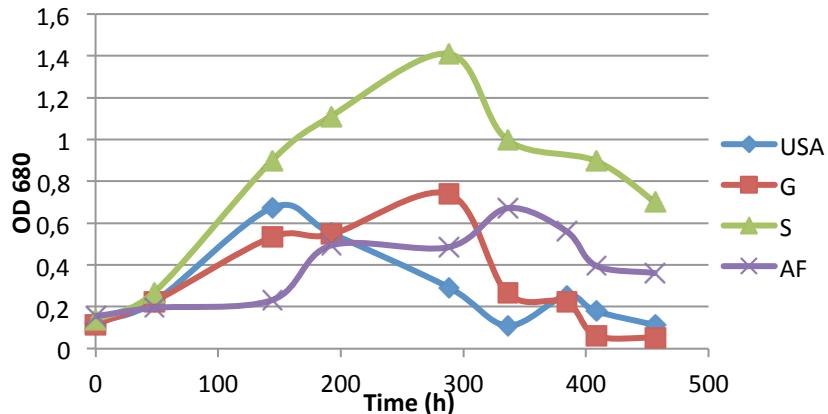


Figure 3: OD₆₈₀ in BG11+ medium.

The best growth was performed by strain from Switzerland in all of media, although the higher increase of optical density was measured in BBM (OD₆₈₀ 1.45). The same medium seems to be also the most suitable for cultivation of HMP strains from Germany and USA. The lowest growth shows the African strain, although the better growth was observed in BG11+. Similar results were obtained by measuring of OD at 720 nm (results not showed).

At the start of cultivations all strains have better physiological state in BBM medium in range of quantum yield 0.65–0.75. During the cultivation, quantum yield of the strains from USA, Germany and Africa settled at the range 0.70–0.76 in all media, unlike the African strain that does not exceed the value 0.70 and during its cultivation QY was decreased. This decline of QY is linked to weak growth of African strain.

3.2 Growth phases and number of cells

Table 2 shows the number of cells in BG11 medium. The strain from Switzerland exhibits the highest values, while the cell number of American and German strains was three times smaller, even though the cultures were characterized by a predominance of flagelloid cells. The lowest values were measured at African strain, which did not exceed 200 000 cells/ml.

Table 2: Number of cells in BG11 medium

Time (h)	S	G	USA	AF
0	123 333	96 667	123 333	160 000
72	270 000	213 333	369 667	126 667
120	910 000	300 000	463 333	150 000
168	1 513 333	586 667	553 333	163 333
240	1 223 333	393 333	496 666	153 333

The number of cells for all HMP strains cultivated in BG11+ is summarized in the *Table 3*. The highest number of cells shows the strain from Switzerland, which reaches nearly 2 000 000 cells/ml. The lowest values were measured at African strain, which did not exceed 1 000 000 cells/ml.

Table 3: Number of cells in BG11+ medium

Time (h)	S	G	USA	AF
0	106 667	106 667	86 667	113 333
48	160 000	170 000	203 333	100 000
144	436 667	1 353 333	1 183 333	180 000
192	1 193 333	463 333	540 000	446 667
288	1 883 333	713 333	456 667	460 000
336	810 000	186 667	143 333	776 667
384	1 236 667	283 333	206 667	496 667
408	603 333	4 3333	140 000	396 667
456	416 667	6 667	150 000	453 333

In all media the lowest number of cells exhibited the strain from Africa and during the cultivation showed high increase of forming palmelloid cells, which refers to the poor rise of the biomass. The highest number of cells reaches the strain from Switzerland, mainly in BBM medium (*Table 4*) with the gradual increase of palmelloid cells.

Table 4: Number of cells in BBM medium

Time (h)	S	G	USA	AF
0	166 667	116 667	103 333	90 000
48	250 000	176 667	270 000	193 333
144	1 290 000	660 000	1 352 000	106 667
192	2 380 000	1 420 000	1 503 333	153 333
288	1 940 000	1 200 000	1 690 000	450 000
336	1 526 667	400 000	756 667	366 667
384	1 406 667	160 000	943 333	623 333
408	646 667	80 000	486 667	216 667
456	546 667	53 333	73 333	86 667

3.3 Doubling time (DT)

The most shorter doubling times (25 h) were calculated in experiments with HMP strains from Switzerland and Germany both in BBM medium. American strain shows the best DT 31 h in BBM cultivation too. While the highest values of DT were observed in the BG11 medium, where growth was slowest in all strains. The strain from Africa exhibited the shorter DT 47 h in BG11+ cultivation, where the highest growth was observed.

3.4 Total nitrogen analysis

The amount of nitrogen in cultivation environment is related with the growth of cultures (results not showed). In experiments with BBM medium the levels of total nitrogen were completely decreased under limited concentration for growth at HMP strains from Switzerland, Germany and/or USA. The consumption of nitrogen by African strain was significantly lower due to poor rise of biomass. The similar trends of nitrogen depletion were observed at BG11+ medium in all strain cultivations including HMP from Africa, but the final determined concentration of nitrogen was not under growth limits.

3.5 ICP-MS analysis

Elementary analysis was used for monitoring of the nutrient level in medium during the cultivation with the aim to determine individual demands of HMP strains from different locations (results not showed). During the cultivation highest usage of P, Zn and Fe was observed in BG11 medium. The limited amount of P may be caused first to the usage of element in energetic metabolism, second to its absorption on the surface of cells. Important decrease of Fe and Zn in medium could be due to higher oxydo-reduction activities in cells observed mainly at strain from Switzerland. The element K is presented in higher concentration in media BBM and BG11+, which probably caused the increase of Mg and Mn consumption. This reaction could be a form of stress response to the presence of osmoactive compound in cultivation medium. There was no significant difference in element amounts and/or consumption trends between individual HMP strains.

4 Conclusion

With the growing demand of natural astaxanthin is also growing development of cultivation devices and exploring different strains of *Haematococcus* from different localities¹⁰.

From all studied cultures mainly the strain of Switzerland achieves the highest optical density, number of cells, quantum yield and the lowest doubling time in BBM medium. It should be the potential candidate for biotechnological use under described growth conditions. On the opposite side, the strain from Africa exhibited the lowest growth rate and highest doubling time, although higher increase of culture biomass was observed in BG11+. For strains from USA and Germany is more suitable BBM medium with highest amount of flagelloid cells in the suspension. The consumption of nitrogen correlates with optical density in all studied strains as well as the element demands were very similar in all used cultures too.

The next experiments will be focused on the effects of chosen physical factors like temperature, light intensity, pH of cultivation medium etc. on the growth of studied strains.

5 References

1. KANG, CH. D., et al. Astaxanthin biosynthesis from simultaneous N and P uptake by the green alga *Haematococcus pluvialis* in primary – treated wastewater. *Biochemical Engineering Journal*. 2006, Vol. 31, No. 3, P. 234–238.
2. CHEN, Z., WANG, G., NIU, J. Variation in Rubisco and other photosynthetic parameters in the life cycle of *Haematococcus pluvialis*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 2012, Vol. 30, No. 1, P. 136– 145.
3. WANG, B., et al. Cellular Capacities for High-Light Acclimation and Changing lipid Profiles across Life Cycle Stages of the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *PloS ONE*. 2014, Vol. 9, No. 9, P.
4. NOROOZI, M., et al. Morphological Changes in the Life Cycle of the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1997, Vol. 84, No. 1, P. 94–97.
5. CIFUENTES, A., et al. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biological Research*. 2003, Vol. 36, No. 3 – 4, P. 343–357.
6. RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Culture*. Second Edition, 2013. John Wiley & Sons. 719 s. ISBN 978-1-118-56718-0.
7. LORENZ, R., CYSEWSKI, G. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*. 2000, Vol. 18, No. 4, P. 160–167.
8. NOROOZI, M., et al. Comparative biodiversity and effect of different media on growth and astaxanthin content of nine geographical strains of *Haematococcus pluvialis*. *African Journal of Biotechnology*. 2012, Vol. 11, No. 84, P. 15049-15059.
9. ALLEWAERT, C., et al. Species diversity in European *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales). *Phycologia*. 2015, Vol. 54, no. 6, P. 583-598.
10. GARCIA-MALEA, M. C., et al. Modelling of growth and accumulation of carotenoids in *Haematococcus pluvialis* as a function of irradiance and nutrients supply. *Biochemical Engineering Journal*. 2005, Vol. 26, No. 1–3, P. 107-114.

Synthesis of Oxandrolone Metabolites

Pavol Csiba¹

Nicolas Kratena, Peter Gärtner

¹Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Department of Organic Chemistry

Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia

²Vienna University of Technology, Faculty of Technical Chemistry, Institute of Applied Synthetic Chemistry
xcsiba@stuba.sk

1 Introduction

The scope of the work was to synthesise intermediates of metabolites of Oxandrolone, which are in interest in doping analysis. Oxandrolone is synthetic anabolic steroid, derivate of dihydrotestosterone with oxygen on position 2 and methyl group on position 17. The suggested route for synthesis of Oxandrolone metabolite **M2** is shown on Figure 1. The starting material of the synthesis is protected epiandrosterone or protected dehydroepiandrosterone which has to be hydrogenated during the synthesis. In synthesis of **M1** metabolite, epimerization of methyl group on position 13 has to be performed as first step as shown on Figure 2. A similar way is used in synthesis of metabolites of other steroids.

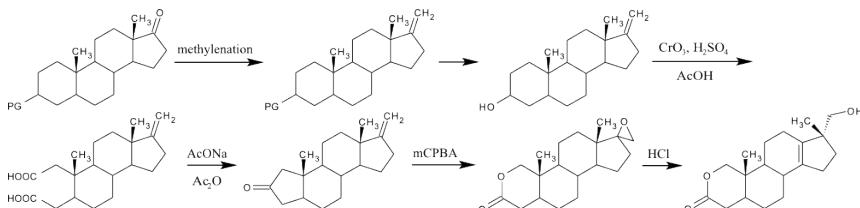


Figure 1: Synthesis of M2 metabolite



Figure 2: Epimerization of methyl group on position 13

2 Experimental

During synthesis of selected intermediates, different synthetic, isolation and identification methods were used.

For TLC, Merck Millipore TLC Silica gel 60 W F254s was used. The spots on plates were detected by aqueous solution containing 10 % ceric sulfate and 15 % sulfuric acid. Column chromatography was performed on Merck Millipore Silica gel 60 (0.040-0.063 mm) as stationary phase. MPLC was performed on device from company Büchi with the same stationary phase as for column chromatography. For all chromatographic procedures, different mobile phases were used. The ratios of solvents in mobile phases is given as ratio by volume. Given R_f values were obtained on TLC plates.

For filtration of palladium on carbon from reaction mixture, Merck Millipore Celite® 545 was used.

Structure of products was confirmed using NMR. NMR spectra were obtained on device Bruker Avance 200 MHz, the structure of Oxandrolone was confirmed on Bruker Avance 400 MHz. Chemical shifts are referred to TMS ($\delta = 0$ ppm), the samples for NMR were dissolved in CDCl₃. Reference spectra were obtained using prediction tool from Institute of Chemical Sciences and Engineering of Swiss Federal Institute of Technology in Lausanne¹. Multiplets of hydrogens on steroid skelet were not interpreted.

In synthesis, commercially available chemicals and solvents from companies International Pharmaceuticals, VWR Chemicals, Sigma Aldrich, Fluorchem, Fluka, Aldrich Chemistry, Acros Organics and Merck were used, along with previously prepared chemicals. During all synthetic and work-up steps, distilled water was used and is referred as water.

2.1 Epimerization of dehydroepiandrosterone acetate

The intermediates of **M2** metabolite of Oxandrolone have configuration (S) on the carbon on position 13. The intermediates of **M1** metabolite have configuration (R) on the same position. Therefore, in order to obtain both isomers, epimerization of methyl group on position 13 has to be done as first step in the synthesis. The reaction scheme is shown on Figure 2, with dehydroepiandrosterone acetate as starting material.

1 equivalent of dehydroepiandrosterone acetate (7.300 g, 0.22 mol) and 1.7 equivalents of *o*-phenylenediamine (3.970 g, 0.37 mol) were dissolved in 75 cm³ acetic acid obtaining brown-orange solution which was refluxed overnight. Afterwards, the reaction mixture was let to cool down by r.t., mixed with 100 cm³ water and extracted with 150 cm³ ethyl acetate. Organic phase was washed with small portions of water, neutralized with sodium bicarbonate, dried over sodium sulfate and solvent was evaporated. Water phase form first extraction was extracted with 70 cm³ ethyl acetate and worked up in the same way. The product of both extraction was dissolved in dichloromethane and purified by MPLC with petrol ether and ethyl acetate (15 % to 35 % of ethyl acetate) as mobile phase. Starting material was recovered from MPLC. Structure of product was confirmed by ¹H NMR. All over, 4.700 g of product in form of white crystals were obtained (yield of 64 %). ¹H NMR: $\delta = 5.406$ (d, $J = 4.89$ Hz, carbon 6), 4.685–4.524 (m, carbon 3), 2.533–2.091 (m),

2.033 (s, CH₃ of acetyl group), 2.008–1.135 (m), 1.045 (s, CH₃ on carbon 10), 0.884 (s, CH₃ on carbon 13) ppm. Rf = 0.467 (petrol ether / ethyl acetate, 13:7)².

2.1 Protecting groups in Oxandrolone metabolites synthesis

In the synthesis of target molecules, various protecting groups were used. During synthesis steps, the protecting groups had to be introduced to or removed from substrate in order to avoid unwanted reactions on hydroxyl group on position 3.

(13S) epimer of dehydroepiandrosterone acetate was deprotected in order to introduce *tert*-butyldimethylsilyl protecting group. Such protected compound was later used in methylation reaction. To 1 equivalent of pure (13S) epimer of dehydroepiandrosterone acetate (0.201 g, 0.61 mmol), 2.5 equivalents potassium carbonate (0.210 g, 1.52 mmol) and 10 cm³ methanol were added and the reaction mixture was refluxed for one hour. Reaction scheme is shown on Figure 3. The solvent was evaporated, the rest was mixed with 5 cm³ water and three times extracted with 5 cm³ dichloromethane. The organic layer was dried over sodium sulfate and the solvent was evaporated. Yield of the reaction is almost quantitative. Product of the reaction is dehydroepiandrosterone (**1a**)³. ¹H NMR: δ = 5.406 (d, J = 4.89 Hz, carbon 6), 4.685–4.524 (m, carbon 3), 2.533–2.091 (m), 2.033 (s, CH₃ of acetyl group), 2.008–1.135 (m), 1.045 (s, CH₃ on carbon 10), 0.884 (s, CH₃ on carbon 13) ppm. Rf = 0.255 (petrol ether / ethyl acetate, 3:1).

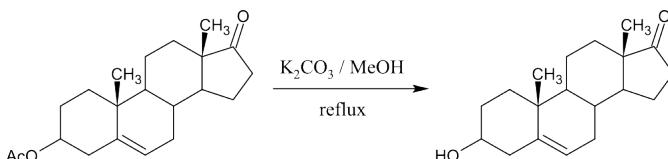


Figure 3: Deprotection of dehydroepiandrosterone acetate

Tert-butyldimethylsilyl protecting group was introduced to the molecules of dehydroepiandrosterone and epiandrosterone to protect hydroxyl group during methylation reaction performed on position 17. During synthesis we have found out that acetic protecting group is hydrolyzed in basic conditions of the reaction and therefore has to be replaced with protecting group not sensitive to basic conditions. Procedure of introduction of *tert*-butyldimethylsilyl group into dehydroepiandrosterone and epiandrosterone is the same. To 1 equivalent of steroid 1.8 equivalents of *tert*-butyldimethylsilyl chloride and 2.2 equivalents of imidazole were added. The mixture was dissolved in 5 cm³ dimethyl formamide and stirred by r.t. for three days. Solvent was evaporated, obtained solid was dissolved in mixture of 1 cm³ 2 M hydrochloric acid, 5 cm³ water and 5 cm³ ethyl acetate. Water layer was extracted two times with 5 cm³ ethyl acetate, combined organic layers were washed with 10 cm³ water, dried with sodium sulfate and the solvent was evaporated. Dehydroepiandrosterone was fully converted into desired product, epiandrosterone was purified by column chromatography (mobile phase petrol ether / ethyl acetate, 15:1) to give a yield of 50 %. In both products, traces of dimethyl formamide were still detectable by ¹H NMR. Reaction scheme of introduction of the *tert*-butyldimethylsilyl group is shown on Figure 4⁴. The yield of both reactions

together with Rf values with petrol ether and ethyl acetate (rations given in table) and chemical shift from ¹H NMR are given in Table 1.

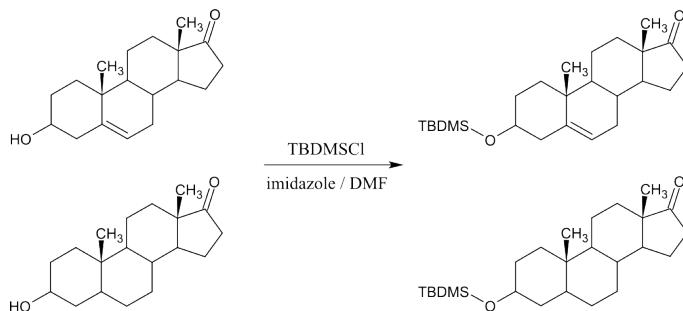


Figure 4: Protection with *tert*-butyldimethylsilyl chloride

During the synthesis, dehydroepiandrosterone pivalate was used in hydrogenation reaction. The comparison of pivalate and acetate protecting group in the hydrogenation reaction is given in respective section.

Table 1: Properties of TBDMS protected dehydroepiandrosterone and epiandrosterone

Code	Substrate	PG	Yield	Rf (solv. ratio)	¹ H NMR (ppm)
1b	dehydro- epiandrosterone	TBDMS	100 %	0.767 (10:1)	5.285 (d, <i>J</i> = 4.9 Hz, carbon 6) 3.426 (tt, <i>J</i> = 10.8, 5.8 Hz, carbon 3) 2.338 – 1.198 (m) 0.996 (s, CH ₃ on carbon 13) 0.856 (s, CH ₃ on carbon 10) 0.830 (s, CH ₃ of <i>tert</i> -butyl) 0.001 (s, CH ₃ of TBDMS) 3.501 (m, carbon 3) 2.364 – 1.208 (m)
1c	epiandrosterone	TBDMS	50 %	0.577 (15:1)	0.834 (s, CH ₃ of <i>tert</i> -butyl) 0.804 (s, CH ₃ on carbon 13) 0.775 (s, CH ₃ on carbon 10) 0.000 (s, CH ₃ of TBDMS)

2.2 Hydrogenation on palladium catalyst

In the starting material, dehydroepiandrosterone, is endocyclic double bond between carbons on positions 5 and 6. This endocyclic C=C bond is missing in Oxandrolone and its metabolites and intermediates of metabolites, therefore hydrogenation of the double bond must be performed prior to methylenetion reaction on carbonyl carbon in position 17. One of the easiest and cheapest way is to use hydrogen under high pressure and palladium on carbon as catalysts. As well, this reaction gives excellent yields. The hydrogenation reaction was performed on (13*R*) epimer of

dehydroepiandrosterone protected with acetate and pivalate group. Reaction scheme is shown on Figure 5.

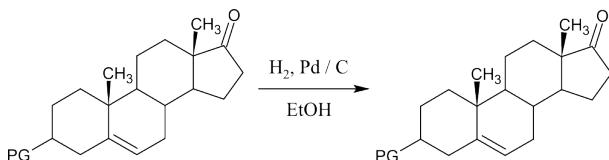


Figure 5: Hydrogenation of protected dehydroepiandrosterone

The hydrogenation process was the same for both acetate and pivalate protected substrate. 1 equivalent of substrate was dissolved in ethanol and argon atmosphere was introduced. Afterwards, palladium catalyst in form of palladium on carbon was added (amount in mol. percentage is given in Table 2) and balloon with hydrogen was connected to apparatus (has to be refilled daily). The reaction was allowed to stir for four days (or until signals of endocyclic double bond were not detectable by NMR anymore). After the end of the reaction, the solution was filtrated over Celite and washed with ethanol until clear colourless solution was obtained⁵. Then solvent was evaporated to obtain product in form of white crystals. The properties of products with acetate and pivalate protecting group are compared in Table 2.

Table 2: Properties of acetate and pivalate protected (13R) epimer of epiandrosterone

Code	PG	% Pd	Yield (%)	¹ H NMR (ppm)
2a	acetate	2.9	90	4.622 (dt, $J = 10.7, 5.4$ Hz, carbon 3) 2.379 – 2.040 (m) 1.959 (s, CH ₃ of acetate) 1.808 – 1.092 (m) 0.910 (s, CH ₃ on carbon 13) 0.606 (s, CH ₃ on carbon 10)
2b	pivalate	3.0	90	4.649 (m, carbon 3) 2.296 – 1.260 (m) 1.172 (s, CH ₃ of pivalate) 0.976 (s, CH ₃ on carbon 13) 0.681 (s, CH ₃ on carbon 10)

2.3 Methylenation of ketone on position 17

The methylenation reaction of ketone on position 17 on steroid skelet is crucial reaction that has to be performed before the oxidation of hydroxyl group on position 3 to dicarboxylic acid. Otherwise, there would be two possible reaction centers for oxidation reaction. This can lead to opening of both A and D rings of steroid.

During our synthetic study, it was very hard to obtain any product by Wittig reaction, even by trying different combinations of bases and solvents. The Wittig reaction was performed only on (13S) epimer of epiandrosterone and dehydroepiandrosterone. During synthesis we have found out that acetate protecting group is unstable in the

reaction conditions. This was the purpose of introducing the *tert*-butyldimethylsilyl protecting group into the starting material. Since Wittig reagent is sensitive to humidity and air, the reaction was performed under argon atmosphere. Comparison of all Wittig reactions performed are given in Table 3.

The common procedure for Wittig reaction performed with potassium *tert*-butoxide in dry DMSO is following: Equimolar mixture of methyltriphenylphosphonium bromide and potassium *tert*-butoxide (5.4 to 7.4 equivalents) were dissolved in small amount of dry DMSO (approx. 2 cm³) and heated to 80°C for one hour. Afterwards, 1 equivalent of steroid dissolved in small amount of dry DMSO was added to the reaction mixture. The reaction was stirred for 2 hours at 80 °C and controlled by TLC with petrol ether and ethyl acetate (10:1) as mobile phase. The reaction mixture was poured into ice, 2 cm³ Brine were added and water phase was extracted three times with 3 cm³ diethyl ether. Combined organic layers were dried over sodium sulfate and solvent was evaporated⁶.

For reaction performed with *n*-butyllithium, another approach was used. Equimolar mixture (4.8 equivalents) of methyltriphenylphosphonium bromide and *n*-butyllithium was stirred by 0 °C for 1 hour in absolute THF. Then, 1 equivalent of steroid (epiandrosterone) in 15 cm³ THF was added. The reaction mixture was stirred overnight by r.t. and then refluxed for another 4 hours. The mixture was let to cool to r.t., poured into water and extracted with diethyl ether. Combined organic layer were dried with sodium sulfate and the solvent was evaporated⁷.

The Wittig reaction was performed with sodium hydride as base as well on steroid with and without endocyclic double bond protected with *tert*-butyldimethylsilyl group. Mixture of 1.5 equivalents of methyltriphenylphosphonium bromide and 5 equivalents of sodium hydride in form of 60 % dispersion in mineral oil was stirred in THF by r.t under argon atmosphere until the colour changed. Afterwards, steroid dissolved in THF was added and reaction was controlled by TLC. The ¹H NMR spectra of crude products show new signals which could belong to the methylene group on position 17. By the end of my work, the product was not purified, so I am not able to evaluate the result⁸.

Table 3: Comparison of Wittig reactions

Code	PG	Endocyclic C=C	Base	Solvent	Desired product
3a	AcO	yes	tBuOK	DMSO	yes
3b	-	no	tBuOK	DMSO	no
3b	-	no	nBuLi	THF	no
3c	TBDMS	yes	tBuOK	DMSO	no
3c	TBDMS	yes	NaH	THF	-
3d	TBDMS	no	tBuOK	DMSO	no
3d	TBDMS	no	NaH	THF	-

As shown in Table 3, only one attempt of Wittig reaction was successful. In the reaction the acetate protecting group was hydrolysed as well, which saves one step in the synthesis – deprotection. Other methods were tried to give good overview on all possibilities of the reaction.

The properties of obtained product (structure shown on Figure 6) are following: ^1H NMR: δ = 5.293 (d, J = 5.1 Hz, carbon 6), 4.573 (m, methylene group), 3.457 (m, carbon 3), 2.249–1.224 (m), 1.188 (s, CH_3 on carbon 10), 0.965 (s, CH_3 on carbon 13) ppm. R_f = 0.186 (petrol ether / ethyl acetate, 10:1).

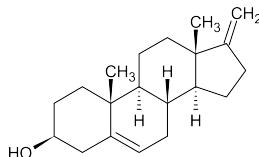


Figure 6: Product of Wittig reaction performed on dehydroepiandrosterone acetate

Nysted reagent was tried in methylenation reaction as another possibility after the Wittig reaction did not give sufficient results. The reaction scheme of methylenation using Nysted reagent is shown on Figure 7. First step of the preparation of Nysted reagent is activation of zinc. Zinc powder ($<10 \mu\text{m}$) was mixed with saturated hydrochloric acid and stirred for 1 minute. The liquid was poured away and solid was washed with small portions of water, ethanol and diethyl ether and was dried by 50°C . Under argon atmosphere, 10 equivalents of zinc (0.458 g, 7.00 mmol), 2 cm^3 THF and 3.3 equivalents dibromomethane (0.400 g, 2.30 mmol) were mixed and cooled down to -40°C . 1.3 equivalents titanium tetrachloride in form of 1 M solution (2.10 mmol, 2.1 cm^3) were added and the mixture was stirred by 0°C for three days. Then, 1 equivalent of epiandrosterone pivalate (0.260 g, 0.70 mmol.) was added and the reaction was stirred by r.t. and controlled by TLC. On the ^1H NMR spectrum of reaction mixture shows new signals, so it is possible that the methylenation reaction was successful. However, the product was not purified during my work in order to confirm the desired product⁹.

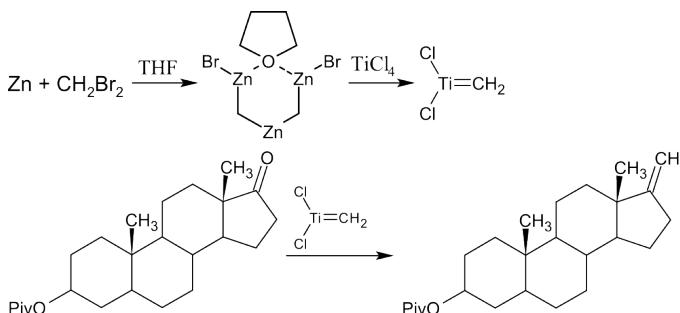


Figure 7: Methylenation using Nysted reagent

2.4 Oxidation to dicarboxylic acid

On the product obtained from one successful Wittig reaction oxidation to dicarboxylic acid (compound 4) was performed. First step of the reaction is oxidation of

the hydroxyl group on position 3 to ketone followed by ring opening reaction on ring A. The reaction scheme is shown on Figure 8.

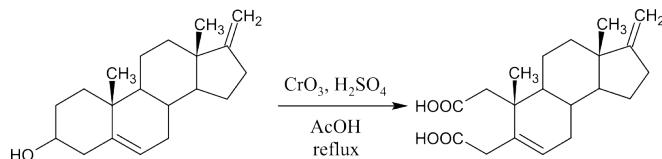


Figure 8: Oxidation of C17-methylenated dehydroepiandrosterone to dicarboxylic acid

As first step, 1 equivalent of dehydroepiandrosterone methylenated on position 17 (compound **3a**, 0.033 g, 0.12 mmol) was dissolved in 3 cm³ of acetic acid and heated to 75°C. Mixture of 1.5 equivalents chrome trioxide (0.017 g, 0.17 mmol), 8.2 equivalents sulfuric acid (0.05 cm³) and 0.2 cm³ water was added to the solution. Reaction mixture was refluxed and controlled by TLC (petrol ether and ethyl acetate, 3:1 with addition of 10 % of acetic acid). After the end of the reaction, the dark reaction mixture was extracted few times with together 10 cm³ water and 40 cm³ ethyl acetate and organic layer was evaporated. Afterwards, the solid was dissolved in 15 cm³ of 5 N solution of sodium hydroxide and extracted two times with diethyl ether (together 15 cm³). Water phase was mixed with saturated hydrochloric acid to pH 2. The precipitate was extracted two times with 15 cm³ ethyl acetate, organic layers were combined, washed with water and Brine, dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated¹⁰. From the ¹H NMR spectrum of fraction, which should contain product, is not visible the formation of desired dicarboxylic acid. Moreover, according to the ¹H NMR spectrum it seems that the steroid skelet was partially destroyed by the reaction conditions (missing signals of the skelet). Therefore, optimisation of the method is needed in order to get dicarboxylic acid.

Since the chrome trioxide is corrosive, highly toxic and carcinogen, the work with it demands proper precautions. The rests of chrome trioxide was mixed with *i*-propanol and poured away once the colour changed to green.

2.5 Oxandrolone extraction

In order to obtain standard of Oxandrolone (structure on Figure 9) in as purest form as possible, it was extracted from pills from company International Pharmaceuticals containing 10 mg of Oxandrolone per pill. The pills (together 200 pieces) were crashed and mixed with water and dichloromethane (150 cm³ each). The mixture was stirred vigorously by r.t. for one hour. Afterwards, the organic layer was separated and water phase was extracted with more portions of dichloromethane until no traces of Oxandrolone could have been detected by TLC. The solid rests were washed with mixture of water and dichloromethane (1:1) until no Oxandrolone was present (control by TLC). Combined organic layers were washed with Brine, dried over sodium sulfate and the solvent was evaporated. Then, the solid was dissolved in small portion of dichloromethane and purified by filtration over a layer of silica with mixture of dichloromethane and methanol (50:1). By TLC only one spot was detected. The structure of Oxandrolone was confirmed by ¹H NMR. Together, 1.270 g of pure Oxandrolone was

obtained (yield of 63.5 %) in a form of white powder which is stored under 0°C. ^1H NMR: δ = 4.167 (d, J = 10.9 Hz, carbon 1, ax), 3.854 (d, J = 11.3 Hz, carbon 1, eq), 2.453 (dd, J = 18.7, 12.9 Hz, carbon 5), 2.161 (dd, J = 18.7, 5.9 Hz, carbon 4), 1.786 – 1.186 (m), 1.144 (s, CH₃ on carbon 17), 0.939 (s, CH₃ on carbon 13), 0.797 (s, CH₃ on carbon 10) ppm. Rf = 0.826 (dichloromethane / methanol, 10:1)¹¹.

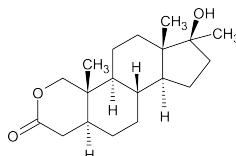


Figure 9: Structure of Oxandrolone

3 Conclusion

During the experimental part, several synthesis were performed with different yields. The inversion of methyl group on position 13 in dehydroepiandrosterone acetate gives fair yield (64 %) and the epimers can be divided easily by flash chromatography.

The reaction of removal of acetic protecting group gave almost quantitative yield. Reactions in which *tert*-butyldimethylsilyl protecting group was introduced to the molecule of substrate gave excellent yields, the only issue is the presence of the dimethyl formamide in the final product which means it can still contain traces of water as well. Before use in synthesis, traces of dimethyl formamide and water should be removed.

Both hydrogenation reactions with palladium on carbon as heterogenic catalyst gave excellent yields. The only difficulty in this reaction can occur during filtration of reaction mixture. Carbon particles can sometimes go through the layer of Celite (they are visible in the filtrate and the product after evaporation). Multiple filtration through fresh layer of Celite may be needed.

From several attempts of Wittig reaction, only one of them was successful, with dehydroepiandrosterone acetate as substrate. Other attempts of introduction of the methylene group were not successful. It is possible that substrate still contains traces of water from work-ups, which protonates the Wittig reagent. In order to remove water, further drying should be performed (e.g. over high vacuum). As well, tough removal of traces of dimethyl formamide should be performed (can hold water). Afterwards, the pure substrate should undergo the same reaction as dehydroepiandrosterone acetate. According to TLC and ^1H NMR, Nysted methylation was successful and can be used instead of Wittig reaction. On the other side, the reaction is not as easily performable as Wittig reaction.

Oxidation of hydroxyl group and opening of ring A to obtain dicarboxylic acid was performed, but the reaction did not give any desired product. Furthermore, on ^1H NMR spectrum are some signals of the original substrate missing, which may mean that the substrate has decomposed in the reaction conditions. Therefore this method should be optimised before further use.

The extraction of Oxanrolone gave good yield. We have obtained standard with high purity (around 95 % according to ^1H NMR analysis).

4 References

1. Luc Patiny – Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne. *Tools for NMR spectroscopists* [online]. [cit. 15.11.2015]. <<http://www.nmrdb.org/>>.
2. WÖLFLING, J. e. a. Synthesis of *D*-seco- 13α -Androst-5-ene Derivatives. *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly*, 2006, vol. 137, no. 8, pp 1099-1107. DOI 10.1007/s00706-005-0500-y.
3. GENELABS TECHNOLOGIES, INC.: DHEA composition and method. PARASRAMPURIA, J. e. a. International Patent Number US 007045513 B1. 16.5.2006.
4. COREY, E. J., VENKATESWARLU, A. Protection of hydroxyl groups as *tert*-butyldimethylsilyl derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 1972, vol. 94, no. 17, pp 6190-6191. DOI 10.1021/ja00772a043.
5. SAGE THERAPEUTICS, INC.: Neuroactive steroids, compositions, and uses thereof. UPASANI, R. B., e. a. International Patent Number WO2013036835 A1. 14.3.2013.
6. MACDONALD, B. S.: The identification of 17α -hydroxy- 17 -methyl- $1,4$ -androstadien-3-one as a metabolite of the anabolic steroid drug 17β -hydroxy- 17 -methyl- $1,4$ -androstadien-3-one in man. *Steroids*, 1971, vol. 18, no. 6, pp 753-766. DOI 10.1016/0039-128X(71)90034-1.
7. HANTOS, S. M. e. a. Synthesis of trichiliasterones A and B – 16 -Ketosteroids isolated from *Trichilia hirta* and *Trichilia Americana*. *Canadian Journal of Chemistry*, 2001, vol. 79, no. 11, pp 1747-1753. DOI 10.1139/v01-126.
8. AL-FOUTI, K., HANSON, J. R. The stereochemistry of osmylation of 2 - and 17 -methylene- 5α -androstanes. *Journal of Chemical Research*, 2003, no. 4, pp 232-233. DOI 10.3184/030823403103173606.
9. Lombardo, L. Methylenation of Carbonyl Compounds: (+)- 3 -methylene-*cis*- p -menthane. *Organic Syntheses*, 1987, vol. 65, pp 81. DOI 10.15227/orgsyn.065.0081.
10. BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC.: Novel cyp17 inhibitors. CHU, D. e. a. International Patent Number WO 2011088160 A3. 13.10.2011.
11. CHOUDHARY, M. I. e. a. New oxandrolone derivatives by biotransformation using *Rhizopus stolonifer*. *Steroids*, 2009, vol. 74, no. 13-14, pp 1040-1044.

Acknowledgement: This article was written thanks to grant from CEEPUS III which financially supported my stay at Vienna University of Technology. The facilities of Institute of Applied Synthetic Chemistry and co-workers from research group are gratefully acknowledged.

Využitie pokročilého fentonovského procesu na degradáciu chlórovaných polutantov

Oľga Čižmárová*

Lukáš Hrdlička

Jozef Prousek

Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie,

Ústav chemického a environmentálneho inžinierstva

Radlinského 9 812 37 Bratislava Slovenská republika

*o.cizmarova@centrum.sk

1 Úvod

Počiatkom 21. storočia začalo ľudstvo čeliť problematike odpadových vôd ako väčnej hrozbe. Podľa agentúry WHO sa nedostatok vody týka takmer polovice svetovej populácie, a to z dôvodov politických, ekonomických a klimatologických. Nárast množstva odpadových vôd je dôsledkom zvýšenia výroby, rovnako ako zvyšovania životnej úrovne, keďže tieto aspekty antropogénnej činnosti sú spájané so zvýšenými požiadavkami na vodu [1]. V súčasnosti sú odpadové vody znečisťované širokou škálou polutantov. Zvýšená pozornosť je venovaná najmä skupine organických halogenovaných polutantov, ktoré sa radia k prioritným polutantom životného prostredia. Prioritné polutanty sú charakterizované ich vysokou priemyselnou produkciou, bioakumuláciou v životnom prostredí, perzistenciou a v neposlednom rade aj ťažkou biodegradovateľnosťou. Keďže biologické čistiace postupy nie sú schopné úspešne odstrániť tieto polutanty z odpadových vôd je nutné v čistiarňach odpadových vôd aplikovať chemické metódy čistenia. Spomedzi týchto sú efektívne najmä pokročilé oxidačné procesy (AOPs), ktoré degradujú organické znečistenie na jednoduché fragmenty (aldehydy, alkoholy) alebo ho úplne mineralizujú (oxid uhličitý, voda). Silné oxidačné účinky AOPs procesov sú dôsledkom produkcie vysokoreaktívnych kyslíkových intermediátorov. Jedným z najrozšírenejších AOPs procesov je Fentonova reakcia (FR). Fentonovský systém (železnaté kationy + peroxid vodíka) produkuje hydroxylový radikál ako neselektívne, silné oxidačné činidlo. V dnešnej dobe sa na ekonomickej výhodnej, environmentálnej neškodlivej FR upriamuje čoraz väčšia pozornosť. Hľadajú sa nové modifikácie alebo systémy s podobným oxidačným účinkom ako FR. V modifikáciách sa napríklad využívajú rôzne oxidy železa alebo priamo kovové železo. Dôraz sa klade aj na výskum nanočastic (nZVI, nanomagnetit), ktoré by vzhľadom na ich väčší reakčný povrch a unikátne vlastnosti mohli zvýšiť degradačnú účinnosť fentonovských procesov.

2 Experimentálna časť

Chlórované polutanty boli degradované s využitím Fentonovej reakcie a jej modifikácií, akými sú systémy ZVI/H₂SO₄/H₂O₂ alebo Fe₃O₄/H₂O₂.

Porovnaním argentometricky stanovenej koncentrácie chloridov [c(Cl⁻)] a teoretickej koncentrácie chloridov vo vzorke [c(Cl⁻)_T] sa určila miera degradácie skúmaných polutantov.

2.1 Degradované polutanty

- Kyseliny chlóroctové

Kyseliny monochlóroctová (MCA), dichlóroctová (DCA) a trichlóroctová (TCA) sú halogenované deriváty kyseliny octovej a zaraďujú sa k prioritným polutantom životného prostredia. Chlóroctové kyseliny sú bežne využívané pri priemyselných syntézach, sú aj produktmi degradácie niektorých organických rozpúšťadiel. Pri chlórovaní vody vznikajú ako vedľajšie produkty reakciou chlóru s organickými látkami vo vode [2]. Zistilo sa, že DCA a TCA vznikajú pôsobením enzymu chlórperoxidázy v pôdach bohatých na alifatické a humínové kyseliny a chloridy (bioticky). Ich vznik je však možný aj abiotickou cestou, teda len za prítomnosti humínových látok FLR reakciu [3]. Uvedené halogénderiváty kyseliny octovej vykazujú fytoxickej účinky na lesné ekosystémy, sú taktiež karcinogénne a mutagénne voči živým organizmom [4].

- Chloralhydrát

Chloralhydrát (2,2,2-trichlóretán-1,1-diol) bol prvýkrát syntetizovaný v roku 1832 a od konca 19. storočia je v medicíne bežne používaný ako sedatívum a hypnotikum. V súčasnosti sa využíva aj ako sedatívum pri vyšetrení sluchových evokovaných potenciálov z mozgového kmeňa (skriningové vyšetrenie sluchu) novorodencov [5]. Na pokusných zvieratách vykazoval chloralhydrát mutagénne a karcinogénne účinky [6]. Pri dlhodobej expozícii chloralhydrátom dochádza u ľudí ku zažívacím fažkostiam, vyrážke alebo až k multiorgánovému zlyhaniu. Predávkovanie môže viesť k neurologickým zmenám, srdcové aritmii a kóme [7].

- 1,1,2,2-tetrachlóretán

1,1,2,2-tetrachlóretán (TeCA) sa ako jeden z chlórovaných etánov radí k prioritným polutantom životného prostredia. Chlórované etány majú široké priemyselné využitie ako rozpúšťadlá, suroviny pre priemyselné syntézy, pesticídy, farmaceutiká, prísady do palív, chladiace médiá či pohonné látky. Tento perzistentný polutant vykazuje voči živým organizmom toxickej účinky. U ľudí sa TeCA akumuluje v pečeni, čo vedie k nerovnováhe medzi syntézou a produkciu triglyceridov do krvnej plazmy [8].

- Lindán

Lindán (γ -hexachlórycyklohexán, LIN) je organochlórový pesticíd, ktorý patrí do skupiny perzistentných organických polutantov (POP). Vďaka nízkej rozpustnosti vo vode, vysokej stabilité a vplyvom chlóru, obsiahnutom v jeho štruktúre, je veľmi fažko degradovateľný a v životnom prostredí dochádza k jeho akumulácii. V roku 2009 bola produkcia a používanie lindánu v poľnohospodárstve zakázané, nakoľko sa správa ako endokrinný disruptor, ale jeho využitie vo farmaceutickom priemysle (liečivo pri výskytu vší a svrabu) je stále povolené [9]. Veľmi dobrá rozpustnosť v tukoch vedie k jeho bioakumulácii v živých organizmoch, do ktorých sa lindán dostáva

cez potravinový reťazec. Chronická expozícia lindánom viedie k neurologickým poruchám (záchvaty, krčé). Lindán v organizme tiež zvyšuje produkciu reaktívnych kyslíkových intermediátov (ROS), čo viedie ku vzniku oxidačného stresu a v konečnom dôsledku aj ku fyziologickej nerovnováhe v systéme a patologickým prejavom [10, 11]. Lindán je ako herbicíd stále používaný v rozvojových krajinách a ako perzistentná látka je prítomný v životnom prostredí, kde sa adsorbuje na pôdne čästice [12].

2.2 Fentonova reakcia a jej modifikácie

Fentonova reakcia (FR) sa v súčasnosti používa najmä ako spôsob chemického predčistenia odpadových vôd pred jej biologickým čistením. Kedže patrí medzi AOPs postupy je schopná účinne zdegradovať aj perzistentné halogenované organické polutanty, ktoré sa v týchto vodách nachádzajú a sú biologickým čistením prakticky nedegradovateľné [13]. Silným oxidačným činidlom, ktoré sa vo FR produkuje je hydroxylový radikál (HO^\bullet), ktorý sa radí ku skupine vysokoreaktívnych kyslíkových intermediátov (ROS). HO^\bullet má vysoký štandardný oxidačný potenciál (2,8 V) a reaguje s organickými polutantmi neselektívne [14]. FR objavil v roku 1894 britský vedec Henry John Horstman Fenton a publikoval ju vo svojej práci nazvanej „Oxidácia kyseliny vínnej v prítomnosti železa“, v ktorej poukázal na silný oxidačný účinok na niektoré organické kyseliny spôsobený systémom: železnaté katióny + peroxid vodíka [15].

- Klasická Fentonova reakcia ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$)

Reagentom klasickej Fentonovej reakcie je systém $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Fentonovo činidlo) (1). Klasická FR je homogénna reakcia, ktorá prebieha radikálovým mechanizmom, zahrňajúcim jedno-elektrónovú redukciu peroxidu vodíka rozpustnými železnatými soľami. V tomto stupni sú produkované hydroxylové radikály, ktoré sú schopné zoxidovať väčšinu organických molekúl [16]. Výhodou použitia FR pri čistení odpadových vôd je okrem nízkych prevádzkových nákladov aj fakt, že nezaťahuje životné prostredie.



- Využitie nanomagnetitu vo Fentonovej reakcii ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{H}_2\text{O}_2$)

Reakčný systém $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ ako modifikácia FR je heterogénna reakcia. V magnetite (Fe_3O_4) sú viazané Fe^{3+} aj Fe^{2+} ióny a od ich pomeru závisí aj reaktivita magnetitu. Bolo preukázané, že oxidy železa dokážu iniciovať heterogénne redoxné reakcie na rozhraní pevnnej fázy a roztoku. Zalma a kol. [17] uviedli, že oxidy železa ako magnetit ($\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$), hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) a krokydolit (modrý azbest) produkujú hydroxylové radikály v prítomnosti peroxidu vodíka oxidačno-redukčnými reakciami na povrchu týchto oxidov. V súčasnosti sú nanomateriály veľmi široko priemyselne využívané. Zvýšená prítomnosť týchto nanočastíc v životnom prostredí viedie k skúmaniu ich biotoxicity. Hydroxylové aj superoxidové intermediáty sa radia k ROS spôsobujúcim v organizmoch oxidačný stres, ktorý patrí medzi najrozšírenejšie mechanizmy vyvolávajúce toxickej efekty [16].

- Využitie kovového železa vo Fentonovej reakcii ($\text{ZVI}/\text{H}_2\text{O}_2$)

Modifikácia FR využívajúca reakčný systém $\text{Fe}^0/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ je heterogénna reakcia, ktorá má v porovnaní s klasickou FR vyššiu účinnosť pri degradácii perzistentných organických polutantov, a to pri širšom rozsahu pH [18]. Pri aplikácii kovového železa (ZVI) vo FR

dochádza v kyslom prostredí k priebežnému vzniku železnatých katiónov a zároveň je produkovaný aj vodík (2), ktorý má silné redukčné účinky a tak napomáha pri degradácii odolných polutantov. Fe^{2+} ióny následne reagujú s peroxidom vodíka za vzniku hydroxylových radikálov (1). Navyše v reakčnom systéme dochádza v heterogénnej FR k regenerácii Fe^{2+} iónov z vyprodukovaných železitých katiónov (3).



2.2 Experimentálne údaje

Všetky experimenty boli realizované v Erlenmeyerových bankách s objemom 500 ml. Miešanie bolo vykonávané magnetickým miešadlom Heidolph MR Hei-Standard a miešadielka použité pri miešaní boli potiahnuté teflónom. Úprava pH bola monitorovaná pH metrom HANNA Instruments 2002-02. Kovové železo bolo používané vo forme železnej stružliny zavesenej na sklenej tyčinke ponorennej do vodného roztoku polutantu. Nanoželezo bolo používané vo forme hustej kaše nanočastic.

Tabuľka 1: Degradácia polutantov využitím FR po trojhodinovom experimente

Polutant	Pôvodná koncentrácia polutantu [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Účinnosť degradácie [%]
MCA	0,01	26
DCA	0,01	13
TCA	0,01	-
Chloralhydrát	0,01	22
TeCA	0,01	25
LIN	$1\cdot 10^{-4}$	6

Tabuľka 2: Degradácia polutantov využitím systému ZVI/ $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ po trojhodinovom experimente

Polutant	Pôvodná koncentrácia polutantu [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Účinnosť degradácie [%]
MCA	0,01	49
DCA	0,01	43
TCA	0,01	12
Chloralhydrát	0,01	52
TeCA	0,01	25
LIN	$1\cdot 10^{-4}$	6

Tabuľka 3: Degradácia polutantov využitím systému Fe_3O_4/H_2O_2 po trojhodinovom experimente

Polutant	Pôvodná koncentrácia polutantu [mol·l ⁻¹]	Účinnosť degradácie [%]
MCA	0,01	28
DCA	0,01	19
TCA	0,01	21
Chloralhydrát	0,01	31
TeCA	0,01	31
LIN	1·10 ⁻⁴	29

3 Záver

Jedným z vážnych problémov pri úprave akosti odpadových vôd je odstraňovanie polutantov, ktoré sú zastúpené v nízkych koncentráciách ako aj perzistentných polutantov. Medzi tieto radíme aj chlórované polutanty, ktoré patria do skupiny prioritných polutantov životného prostredia. Zo skupiny chlórovaných polutantov sme sa v predkladanej práci zamerali na chloralhydrát, kyseliny chlórooctové lindán a 1,1,2,2-tetrachlóretán. Ich degradácia bola v laboratóriu realizovaná klasickou Fentonovou reakciou a jej modifikáciami s využitím kovového železa a nanomagnetitu za účelom porovnať účinnosť týchto pokročilých oxidačných metód.

Zo série uskutočnených pokusov možno konštatovať, že modifikovaná Fentonova reakcia je pre praktické využitie vhodnejšou alternatívou v porovnaní s klasickou Fentonovou reakciou a jej modifikáciou s nanomagnetitom. Kovové železo prítomné v reakčnej zmesi zabezpečuje kontinuálne vytváranie Fe^{2+} iónov v priebehu reakcie a preto nie je potrebné túto surovinu dodávať priebežne. Navyše úbytok kovového železa počas reakcie bol takmer zanedbateľný. Počas reakcie v systéme taktiež produkuje vodík, ktorý je známym redukčným činidlom a teda mohol podporiť proces degradácie.

4 Literatúra

1. Pera-Titus M., García-Molina V., Baños M. A., Giménez J., Esplugas S.: Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review. *Applied Catalysis B: Environmental* **47**(2004) 219–256.
2. Hoekstra E. J.: Review of concentrations and chemistry of trichloroacetate in the environment. *Chemosphere* **52** (2003) 355–369.
3. Heal M. R., Dickey C. A., Heal K. V., Stidson R. T., Matucha M., Cape J. N.: The production and degradation of trichloroacetic acid in soil: Results from *in situ* soil column experiments. *Chemosphere* **79** (2010) 401–407.
4. Zhang S., Miao D., Liu A., Zhang L., Wei W., Xie H., Lu W.: Assessment of the cytotoxicity and genotoxicity of haloacetic acids using microplate-based

- cytotoxicity test and CHO/HGPRT gene mutation assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **703** (2010) 174–179.
5. Avlonitou E., Balatsouras D .G., Margaritis E., Giannakopoulos P., Doumadiakis D., Tsakanikos M.: Use of chloral hydrate as a sedative for auditory brainstem response testing in a pediatric population. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* **75** (2011) 760–763.
 6. Merdink J. L., Robinson L. M., Stevens D. K., Hu M., Parker J. C., Bull R. J.: Kinetics of chloral hydrate and its metabolites in male human volunteers. *Toxicology* **245** (2008) 130–140.
 7. Baselt R.: Disposition of toxic drugs and chemicals in man. *Biomedical Publications* **8** (2008) 259–261.Citace 3.
 8. Basu D., Gupta S.K.: Biodegradation of 1,1,2,2-tetrachloroethane in Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) reactor. *Bioresource Technology* **101** (2010) 21–25.
 9. San Román I., Alonso M.L., Bartolomé L., Galdames A., Goiti E., Ocejo M., Moragues M., Alonso R. M., Vilas J. L.: Relevance study of bare and coated zero valent iron nanoparticles for lindane degradation from its by-product monitorization. *Chemosphere* **93** (2013) 1324–1332.
 10. Padma V. V., Sowmya P., Felix T. A., Baskaran R., Poornima P.: Protective effect of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats. *Food and Chemical Toxicology* **49** (2011) 991–998.
 11. Khan A. J., Sharma A., Dinesh K., Parmar D.: Similarities in lindane induced alteration in cytochrome P450s and associated signaling events in peripheral blood lymphocytes and brain. *Food and Chemical Toxicology* **60** (2013) 318–327.
 12. Dercó, J., Dudáš, J., Valičková, M., Šimovičová, K., Kecskés, J.: Removal of micropollutants by ozone based processes. *Chemical Engineering and Processing* **94** (2015) 78–84
 13. Prousek J. : Advanced oxidation processes for water treatment. Chemical processes. *Chemicke Listy* **90** (1996) 229–237.
 14. Bautista P., Mohedano A. F., Casas J.A., Zazo J. A., Rodriguez J. J.: An overiew of the application of Fenton oxidation to industrial wastewaters treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **83** (2008) 1323–1338.
 15. Fenton H.J.H.: Oxidation of Tartaric acid in presence of iron. *Journal of Chemical Society* **65** (1894) 899–910.
 16. Wu H., Yin J., Wamer W.G., Zeng M., Lo Y.M.: Reactive oxygen species – related activites of nano-iron metal and nano-iron oxides. *Journal of Food and Drug Analysis* **22** (2014) 86–94.
 17. Zalma R., Bahamonde A., Casas J. A., et al.: Production od hydroxyl radicals by iron solid compounds. *Toxicology and Enviromental Chemistry*. **13** (1987) 171–187.
 18. Pouran S.R., Raman A.A.A., Daud W.M.A.W.: Review on the application of modified iron oxides as heterogeneous catalysts in Fenton reactions. *Journal of Cleaner Production* **64**(2014) 24–36.

Ďakujem doc. Ing. Jozefovi Prouskovi, CSc. za odborné vedenie, hodnotné rady a pomoc pri vypracovaní práce a Ing. Lukášovi Hrdličkovi za pomoc pri uskutočňovaní experimentov.

Táto práca bola podporená grantom STU v Bratislave s názvom „Program pre podporu mladých výskumníkov“ z roku 2015 č. 1375.

Nanočastice v životnom prostredí a ich toxické účinky

Adriána Drobňáková*

Lukáš Hrdlička

Jozef Prousek

Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie,

Ústav chemického a environmentálneho inžinierstva

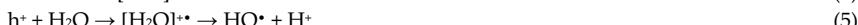
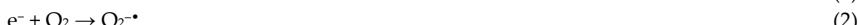
Radlinského 9 812 37 Bratislava Slovenská republika

*drobnakovaadriana@gmail.com

1 Úvod

Životné prostredie, v ktorom žijeme je neoddeliteľnou súčasťou každého jedného z nás, a preto máme zodpovednosť za jeho neznečisťovanie a ochranu. Často sme ale ľahostajní jeho voči čistote. V skutočnosti nesieme plnú zodpovednosť za problémy spojené so znečisťovaním environmentu, ktoré sa týka najmä vody, ovzdušia, pôdy a organizmov. Jedným z uvedených problémov je aj znečisťovanie životného prostredia nanočasticami (NPs). Nanomateriály sú široko používané v rôznych odvetviach priemyslu. Literárnej rešeršou bolo zistené akými rôznymi cestami NPs vstupujú do životného prostredia. Významným zdrojom sú rôzne technológie, ktoré využívajú NPs priamo v technologickom postupe (najčastejšie ako rôzne katalyzátory) alebo sú NPs aplikované ako nosiče liekov, kedy dochádza k priamej expozícii organizmu s NPs. V oblasti nanomedicíny sú ešte mnohé nedoriešené problémy. Na strane jednej sú nanočastice dobrými prenášačmi liekov do organizmu, ale na strane druhej je potrebné zhodnotiť aj toxické účinky použitého nanomateriálu. Napríklad bolo zistené, že často používané uhlíkové nanorúrky vykazujú v organizme podobné toxické účinky ako azbestové vlákna [1]. Z hľadiska toxicity je potrebné aj rozlíšiť mechanizmus príslušnej toxicity. V súčasnosti sa predpokladajú dva zásadné toxické mechanizmy. V prvom mechanizme je to produkcia (až nadprodukcia) reaktívnych kyslíkových intermediatov (ROS), ktoré sú zdrojom oxidačného stresu v organizme. Druhý mechanizmus predpokladá ovplyvnenie génov a v konečnom dôsledku spustenie nežiaducích procesov. Napríklad sa spúšta proces geneticky riadenej smrti bunky – apoptóza. V prípade neurologického pôsobenia práve táto neurotoxicita vedie k rôznym neurodegeneratívnym prejavom, ako sú napríklad Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba alebo spektrum príčin vedúcich k autizmu [2, 3].

V súčasnosti je najväčším problémom čistenie vôd obsahujúcich nízke koncentrácie perzistentných a toxických látok. Fotochemické procesy zohrávajú významnú úlohu pri čistení vôd a preto je v súčasnosti veľká snaha využiť lacné slnečné žiarenie pri degradáciu polutantov hydrosféry vo veľkých slnečných fotoreaktorov. V praxi sa okrem iných fotochemických pokročilých oxidačných technológií (AOTs) využíva aj fotokatalytická degradácia s použitím koloidných polovodičov typu TiO₂/UV [4]. V takýchto systémoch prebieha vytvorenie páru elektrón – diera (e^- a h^+) na povrchu polovodičovej časticie (1), ktoré majú oxidačné alebo redukčné vlastnosti. Tako generovaný elektrón môže redukovať molekulu kyslíka na superoxidový radikálový anión (2) alebo peroxid vodíka (3) alebo samotný polutant (4) za vzniku radikálu a príslušného aniónu. Oxidačné reakcie, ktoré prebiehajú vo valenčnom pásse s generovanou dierou sú napr. oxidácia vody za vzniku HO[•] a protónu H⁺ (5), oxidácia hydroxidového aniónu na HO[•] (6) a oxidácia samotného organického polutantu (7) na príslušný radikálový katión. V reakciách (3, 5 a 6) vzniknutý HO[•] radikál môže reagovať s pridaným organickým substrátom (8) a tým začať proces oxidačnej degradácie [5].



2 Experimentálna časť

Experimentálna časť sa zaoberá praktickým použitím nanočastíc TiO₂, ZnO a magnetitu (Fe₃O₄) ako fotokatalyzátorov pri fotodegradačných procesoch. Magnetit bol pripravený zo zmesi Fe²⁺ a Fe³⁺ iónov pomocou amoniaku, ktorý sa po dekantácii použil v experimentoch vo forme kašovitého materiálu.

Všetky experimenty boli realizované v Erlenmeyerových bankách objemu 500 ml. Východisková koncentrácia degradovaného farbiva Ostazine Yellow H-R bola 400 mg·l⁻¹. Miešanie reakčných zmesí bolo vykonávané magnetickým miešadlom Heidolph MR Hei-Standard a miešadielka použité pri miešaní boli potiahnuté teflónom. Na meranie absorbancie roztokov sa používal Spekol 11 (jednolúčový spektrometer) s použitím sklenej kyvety hrúbky 1 cm. Charakteristiky jednotlivých experimentov sú zobrazené v tabuľke 1. Pri experimentoch A až G bola vykonaná aj analýza CHSK_{Cr} [6] a porovnaná s pôvodnou hodnotou CHSK_{Cr} východiskového roztoku farbiva.

Tabuľka 1: Charakteristiky jednotlivých experimentov

Označenie vzorky CHSK _{Cr}	Činidlá	Podmienky	Výsledky
Bez analýzy	0,3 g TiO ₂	Slnečné žiarenie	Tab. 2
Bez analýzy	0,3 g TiO ₂	Tma	Tab. 3
A	0,3 g ZnO	Slnečné žiarenie	Tab. 4
B	0,3 g Fe ₃ O ₄	Slnečné žiarenie	Tab. 5
C	5,0 ml kaše Fe ₃ O ₄ 2 ml 20%-nej H ₂ SO ₄	Slnečné žiarenie	Tab. 6
D	5,0 ml kaše Fe ₃ O ₄ 0,4 ml 30%-ného H ₂ O ₂	Slnečné žiarenie	Tab. 7
E	5,0 ml kaše Fe ₃ O ₄ 0,8 ml 30%-ného H ₂ O ₂	Slnečné žiarenie	Tab. 7
F	5,0 ml kaše Fe ₃ O ₄ 0,4 ml 30%-ného H ₂ O ₂ 2 ml 20%-nej H ₂ SO ₄	Slnečné žiarenie	Tab. 8
G	5,0 ml kaše Fe ₃ O ₄ 0,8 ml 30%-ného H ₂ O ₂ 2 ml 20%-nej H ₂ SO ₄	Slnečné žiarenie	Tab. 8

Tabuľka 2: Účinnosť degradácie farbiva (%) s použitím TiO₂ a slnečného žiarenia v čase

Čas [hod.]	c [mg·l ⁻¹]	Zvyšková koncentrácia [%]	Účinnosť degradácie [%]
1	250,64	62,66	37,34
3	217,03	54,26	45,74
24	17,51	4,38	95,62

Tabuľka 3: Účinnosť odstránenia farbiva (%) s použitím TiO₂ za tmy v čase

Čas [hod.]	c [mg·l ⁻¹]	Zvyšková koncentrácia [%]	Účinnosť odstránenia [%]
1	239,27	59,82	40,18
3	215,85	53,96	46,04

Tabuľka 4: Účinnosť degradácie farbiva (%) s použitím ZnO a slnečného žiarenia v čase (A)

Čas [hod.]	c [$mg \cdot l^{-1}$]	Zvyšková koncentrácia [%]	Účinnosť degradácie [%]
17,5	0,0	0	100

Tabuľka 5: Účinnosť degradácie farbiva (%) s použitím magnetitu Fe_3O_4 a slnečného žiarenia v čase (B)

Čas [hod.]	c [$mg \cdot l^{-1}$]	Zvyšková koncentrácia [%]	Účinnosť degradácie [%]
31,5	396,64	99,16	0,84

Tabuľka 6: Účinnosť degradácie farbiva (%) s použitím magnetitu Fe_3O_4 , kyseliny sírovej a slnečného žiarenia v čase (C)

Čas [hod.]	c [$mg \cdot l^{-1}$]	Zvyšková koncentrácia [%]	Účinnosť degradácie [%]
28	321,35	78,09	21,91

Tabuľka 7: Účinnosť degradácie farbiva (%) s použitím magnetitu Fe_3O_4 , peroxidu vodíka a slnečného žiarenia v čase (D + E)

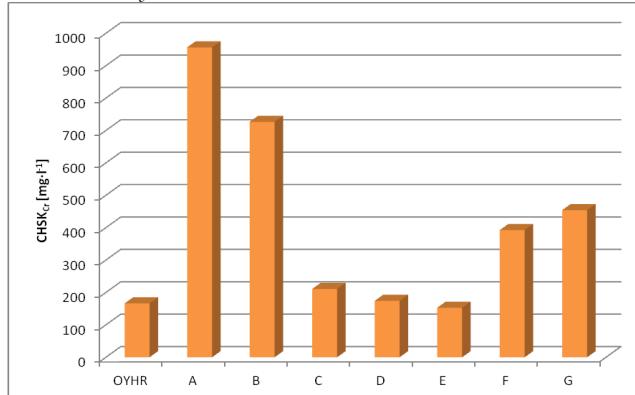
Pridané množstvo H_2O_2 [ml]	Čas [hod.]	c [$mg \cdot l^{-1}$]	Zvyšková koncentrácia [%]	Účinnosť degradácie [%]
0,4	27	323,89	80,97	19,03
0,8	27	53,966	13,49	86,51

Tabuľka 8: Účinnosť degradácie farbiva (%) s použitím magnetitu Fe_3O_4 , peroxidu vodíka, kyseliny sírovej a slnečného žiarenia v čase (F + G)

Pridané množstvo H_2O_2 [ml]	Čas [hod.]	c [$mg \cdot l^{-1}$]	Zvyšková koncentrácia [%]	Účinnosť degradácie [%]
0,4	6,5	4,965	1,24	98,76
0,8	6,5	12,324	3,08	96,92

Jedným z ukazovateľov kvality vôd je aj chemická spotreba kyslíka (CHSK). V našom prípade bola metóda stanovenia CHSK_{Cr} použitá na určenie miery degradácie polutanta (farbiva).

Graf 1: Stanovenie CHSK_{Cr} roztoku štandardu Ostazine Yellow H-R (OYHR) a výsledných reakčných roztokov.



3 Záver

Záverom môžeme konštatovať, že nanočastice predstavujú polutanty životného prostredia, ktoré vykazujú rozmanité toxicke účinky. Z tohto dôvodu sú v práci analyzované prírodné i antropogénne zdroje nanočastic a je diskutovaná ich toxicita.

Z hľadiska praktického využitia je potrebné zdôrazniť, že všetky tri testované materiály a to:

- nano-TiO₂
- nano-ZnO
- nano magnetit Fe₃O₄

vykazovali veľmi dobré degradačné účinky pri degradácii azofarbiva Ostazine Yellow H-R. Zo získaných hodnôt CHSK_{Cr} vyplýva, že farbivo Ostazine Yellow H-R je v CHSK ľahko oxidovateľné, o čom svedčí aj hodnota východiskovej CHSK = 166 mg·l⁻¹, keďže teoretická spotreba kyslíka pre roztok s koncentráciou 400 mg·l⁻¹ predstavuje hodnotu TSK = 695 mg·l⁻¹. Ako z grafu č. 1, prakticky vo všetkých experimentoch došlo k nárastu hodnoty CHSK_{Cr}, čo znamená, že dané farbivo je degradované v použitých experimentálnych sústavách na menšie, v prostredí CHSK_{Cr} ľahšie oxidovateľné fragmenty, prípadne sú degradačné medziprodukty čiastočne mineralizované na oxid uhličitý a vodu.

4 Literatúra

1. Du, J.; Wang, S.; You, H.; Zhao, X. Understanding the toxicity of carbon nanotubes in the environment is crucial to the control of nanomaterials in producing and processing and the assessment of health risk for human: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **36** (2013), 451-462.
2. Karmakar, A.; Zhang, O.; Zhang, Y. Neurotoxicity of nanoscale materials. *Journal of Food and Drug Analysis*, **22** (1) (2014) 147-160.
3. Wu, J.; Ding, T.; Sun, J. Neurotoxic potential of iron oxide nanoparticles in the rat brain striatum and hippocampus. *Neurotoxicology* **34** (2013), 243-253.
4. Chen, H., Nanayakkara, C.H.E., Grassian, V.H.: Titanium Dioxide Photocatalysis in Atmospheric Chemistry. *Chemical Review* **112** (2012) 5919-5948.
5. Hrdlička, L.: Chemické reakcie. (1. vydanie). Slovenská chemická knižnica, Bratislava, ISBN 978-80-89597-21-5, (2014).
6. Horáková, M. a kol. Analytika vody. 2. vyd. Vydavatelství VŠCHT Praha, Praha (2007).

Ďakujem doc. Ing. Jozefovi Prouskovi, CSc. za odborné vedenie, hodnotné rady a pomoc pri vypracovaní práce a Ing. Lukášovi Hrdličkovi za pomoc pri uskutočňovaní experimentov.

Táto práca bola podporená grantom STU v Bratislave s názvom „Program pre podporu mladých výskumníkov“ z roku 2015 č. 1375.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-0122-12.

Nepriame stanovenie síranov metódami atómovej spektrometrie

Bc. Juraj Džurný
Ing. František Čacho, PhD.

Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie
Oddelenie analytickej chémie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
juraj.dzurny@gmail.com

1 Úvod

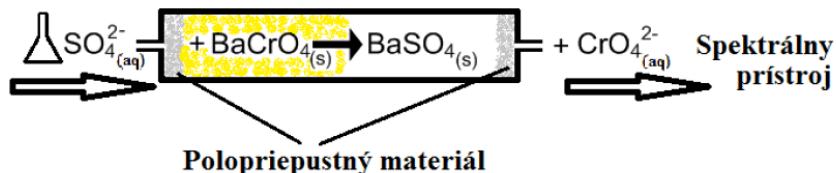
V prírode sa vyskytuje množstvo zlúčenín vo forme síranov. Ako soli kyseliny sírovej sa najčastejšie nachádzajú vo vodách minerálneho pôvodu. Tu majú široké zastúpenie najčastejšie vo forme sodných a draselných solí. So síranmi sa možno ale často stretnúť aj v mliekarenstve, celkovo v potravinárskom priemysle, v kovospracujúcim priemysle a hlavne pri galvanickom pokovaní

Stanovenie síranov v rôznych vzorkách prírodného prostredia v stopových koncentráciách robilo veľké starosti analytikom celé roky. Poznáme niektoré techniky na stanovenie ako využitie iónovo selektívnych elektród^{1, 2}, turbidimetrie³, elektroforézy, metód založených na využití ionexov. Tieto techniky viac menej majú svoje základné nevýhody a to: nízka citlivosť, vysoký limit detektie a požiadavky na množstvo chemikálií. Mnohé z týchto nevýhod sa riešia využitím ionexovej chromatografie, ktorá je však finančne náročná. Preto sme sa v tejto práci rozhodli využiť výmennú reakciu medzi síranovými aniónmi a tuhým chrómanom bárnatým naplneným v prietokovej kolónke. Takto by sme mali vyrobíť produkt detekovateľný bežne dostupným AAS prístrojom, ktorého koncentrácia v roztoku by mala byť ekvivalentná koncentrácií síranov v pôvodnej vzorke.

2 Experimentální časť

Všetko použité laboratórne sklo bolo čistené deionizovanou vodou. Pri vykonávaní experimentov sme používali atómový absorpčný spektrometer UNICAM SOLAAR 939 firmy PYE UNICAM s plameňovým atomizátorom. Ďalej sme použili výbojku s dutou katódou pre chróm. Plameň bol tvorený zmesou acetylén - vzduch. Okrem absorpčného spektrometra sme použili aj atómový emisný spektrometer s budením v mikrovlnne indukovanej dusíkovej plazme s označením MP – AES 4100 od firmy Agilent Technologies. Pri meraniach bol tlak v zhľovači nastavený na hodnotu 240 kPa a bola nastavená snímacia vlnová dĺžka 425,433 nm. Pripravili sme si prietokovú kolónu, ktorá bola zostavená z tela 5 ml striekačky a koncoviek s vlepennými hadičkami. Vnútro bolo tvorené zmesou chrómanu bárnatého a alumíny. Táto zmes bola vo vnútri zaistená dvoma

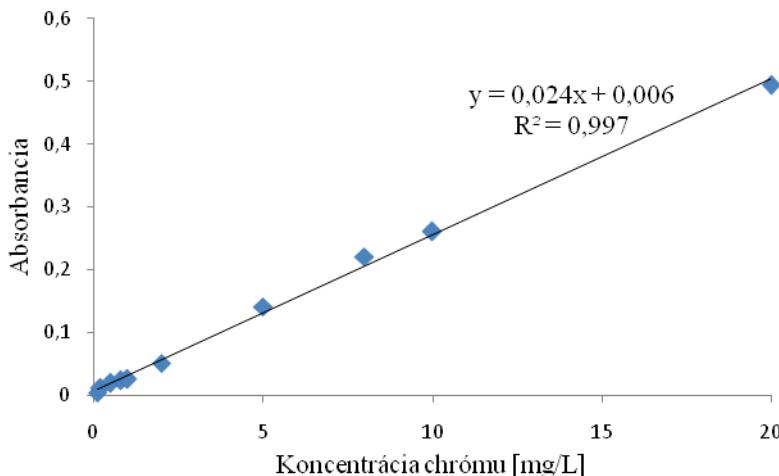
prietkovými fritami. Celá schéma prietkovej kolóny je na Obrázku 1. Kolóna bola pripojená na nasávaciu hadičku zhmlovača a podtlak vyvolaný zhmlovačom nasával roztoky štandardov a vzoriek konštantným prietokom cez kolónu. V nej dochádzalo ku výmennej reakcii a z kolóny do zhmlovača a ďalej do horáka odchádzal roztok obsahujúci rozpustený chróman. Stanovované súrany sme takto zamenili za ekvivalentné množstvo chrómanov ktoré sa dajú stanoviť metódou plameňovej AAS podľa nasledujúcej reakcie v Obrázku 1.



Obrázok 1: Schéma pracovnej kolóny spolu s reakciou

2.1 Validácia stanovenia chrómu metódou FAAS

Linearitu kalibračnej krivky sme testovali v rozmedzí koncentrácií 0,1–50 mg dm³ chrómu. Ako vyplýva z grafu na Obrázku 2, kalibračná závislosť absorbancie od koncentrácie chrómu v roztoku je dostatočne lineárna v rozsahu 0,14–20 mg dm³.



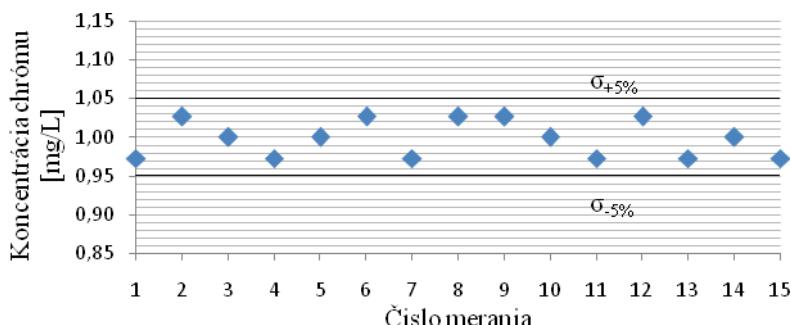
Obrázok 2: Závislosť absorbancie od koncentrácie chrómu

Pre určenie hodnôt LOD a LOQ sme zmerali kalibračnú závislosť pre koncentračný rozsah chrómu 0–1 mg/L s rovnomenrným rozmiestnením meraných bodov. Výsledná závislosť malá lineárny tvar $y = 0,0378x + 0,0019$ s $R^2 = 0,9831$.

Tabuľka 1: Zistené metrologické parametre pre stanovenie chrómu

Metrologický parameter	Zistená hodnota [mg/L]
LOD	0,04
LOQ	0,14

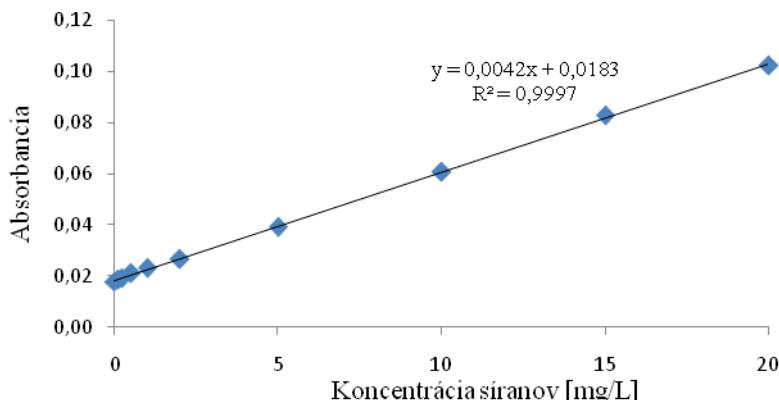
Po týchto meraniach sme sa zamerali na určenie opakovateľnosti stanovenia chrómu. Toto sme vykonali opakovaným meraním absorbancie toho istého roztoku a následným prepočítaním nameraných hodnôt pomocou kalibračnej závislosti. Opakovateľnosť meraní pre $n = 15$ bola RSD = 2,3 %. Záznam nameraných hodnôt je uvedený na Obrázku 3. Pri meraniach bol použitý roztok s koncentráciou chrómu 1 mg/L.



Obrázok 3: Opakovateľnosť stanovenia chrómu (koncentrácia Cr 1mg/L).

2.2 Validácia stanovenia síranov metódou FAAS

Určili sme lineárny rozsah kalibračnej krivky stanovenia síranov meraním absorbancií roztokov s koncentráciami v rozsahu 0–50 mg/L. Ako vidieť na Obrázku 4, kalibračná závislosť je lineárna v rozsahu 0,55–20 mg/L.



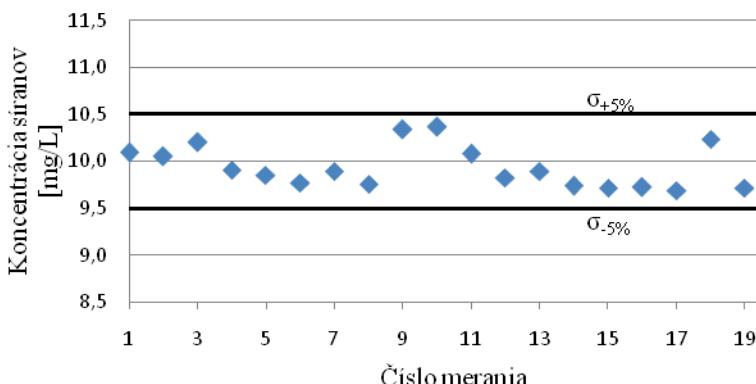
Obrázok 4: Závislosť absorbancie od koncentrácie síranov

Pre zistenie hodnôt LOD a LOQ sme zmerali kalibračnú závislosť pre roztoky s koncentráciou síranov v rozsahu 0–1 mg/L. Koncentrácie roztokov sa menili konštantným krokom 0,1 mg/L. Výsledná kalibračná závislosť má tvar $y = 0,0088x + 0,0121$ $R^2 = 0,9861$ a stanovené hodnoty LOD a LOQ sú uvedené v Tabuľke 2.

Tabuľka 2: Zistené metrologické parametre pre stanovenie síranov

Metrologický parameter	Zistená hodnota [mg/L]
LOD	0,17
LOQ	0,55

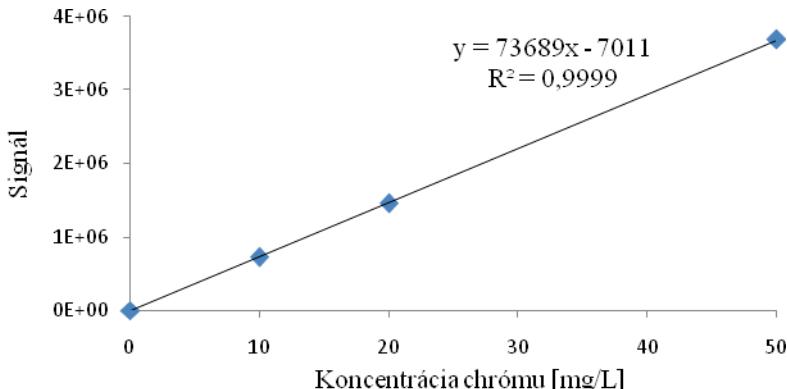
Po týchto meraniach nasledovalo určenie opakovateľnosti stanovenia koncentrácie síranov, na čo sme použili roztok s koncentráciou síranov 10 mg/L. Výsledok meraní je uvedený na Obrázku 5. Opakovateľnosť stanovenia síranov bola RSD = 3,9 %.



Obrázok 5: Závislosť zistenej koncentrácie od počtu meraní pre roztok s obsahom 10 mg/L síranov.

2.3 Validácia stanovenia chrómu metódou MP - AES

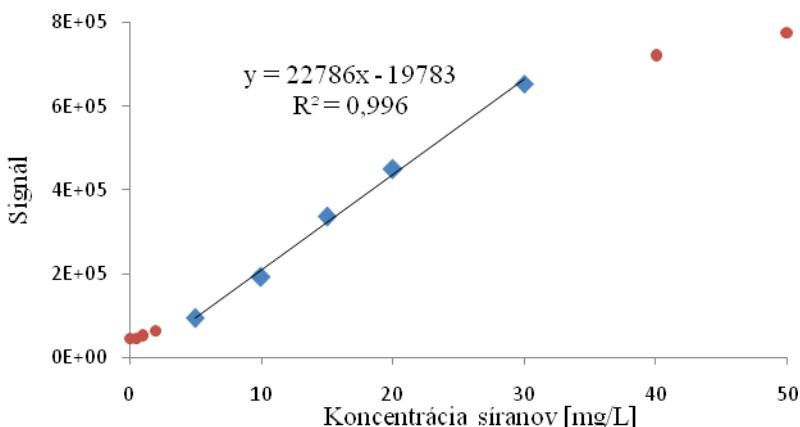
Na určenie koncentrácie síranov sme použili aj metódu MP – AES. Chceli sme porovnať tieto dve metódy pre stanovenie síranov. Pred pripojením kolóny na nasávaciu hadičku prístroja sme sa zamerali na určenie lineárneho rozsahu stanovenia chrómu touto metódou. Testovali sme roztoky chrómu v koncentračnom rozsahu 0–100 mg/L. Ako vyplýva z Obrázku 6, kalibračná závislosť stanovenia chrómu metódou MP-AES pri nastavených podmienkach bola lineárna po koncentráciu 50 mg/L. Kalibračná závislosť je uvedená ako funkcia nameraného signálu (pomer intenzít žiarivého toku vzorky a porovnávacieho roztoku) od koncentrácie chrómu v roztoku.



Obrázok 6: Závislosť signálu od koncentrácie chrómu

2.4 Validácia stanovenia síranov metódou MP - AES

Pre stanovenie síranov metódou MP-AES sme určili lineárny rozsah kalibračnej závislosti. Po pripojení kolóny na nasávaciu hadičku prístroja sme postupne analyzovali kalibračné roztoky síranov vo vode a to v rozsahu koncentrácií síranov 0–50 mg/L. Na Obrázku 7 je závislosť nameraných intenzít od narastajúcej koncentrácie síranov v roztokoch.



Obrázok 7: Závislosť signálu od koncentrácie síranov

Ako vidno z Obrázka 7, kalibračná závislosť bola v tomto prípade lineárna len v rozsahu 5–30 mg/L. Zhoršenie dolnej hranice lineárneho rozsahu oproti plameňovej AAS by sa dalo prisúdiť menej výraznému zníženiu tlaku na výstupe z kolóny prístrojom

MP-AES oproti atómovému absorpčnému spektrometru. Kým pri AAS prístroji je nasávanie zabezpečené podtlakom zo zhmlivoča, nasávacia hadička má vnútorný priemer 0,5 mm a prietok roztoku je 6 mL/min, pri MP-AES spektrometri je nasávanie roztokov zabezpečené peristaltickým čerpadlom hadičkou s vnútorným priemerom 1 mm a prietok roztokov bol 3 mL/min. Zvýšenie prietoku v tomto prípade bolo nežiaduce, lebo spôsobovalo zhoršenie validačných parametrov samotného stanovenia chrómu (užší lineárny rozsah, horšia opakovateľnosť).

4 Závery

Na stanovenie síranov je možné použiť rôzne metódy, väčšina z nich však potrebuje zložité chemické činidlá, alebo finančne náročné prístrojové vybavenie. Nami navrhnutá metóda je hlavne rýchla, technicky jednoduchá a finančne nenáročná. Spotreba chemikálií je viazaná iba na prípravu štandardných roztokov a kolónky s chrómanom bárnatým. Táto kolónka má však veľkú životnosť, čo je ďalšou výhodou tohto postupu. Následnými meraniami a oboznamovaním sa s metódou sme zistili hodnoty lineárnych rozsahov, LOD, LOQ a opakovateľnosti pre stanovenie síranov metódou FAAS. Okrem toho sme určili aj lineárny rozsah nepriameho stanovenia síranov keď ako koncový detekčný systém slúžil atómový emisný spektrometer s mikrovlnne indukovanou dusíkovou plazmom. Medza stanovenia popísaných nepriamych stanovení je na úrovni 0,55 mg/L pre FAAS (respektívne 5 mg/L pre MP-AES). Nie sú to najnižšie hodnoty, avšak keďže sírany nepatria medzi stopové analyty vo vodách, nami popísaný a odskúšaný postup by mohol byť použiteľný pri stanovení síranov v povrchových a minerálnych vodách, prípadne vo vodách z priemyselných technológií.

5 Literatúra

1. POLITI, L. , CHIARALUCE, R. , CONSALVI, V. , CERULLI, N. , SCANDURRA, R. Oxalate, phosphate and sulphate determination in serum and urine by ion chromatography, *Clin. Chim. Acta*, 1989, vol. 184, s. 155.
2. EGOROV, V. V. , NAZAROV, V. A. , OKAEV, E. B. , PAVLOVA, T. E. J. Sulfate-selective electrode and its application for sulfate determination in aqueous solutions, *Anal. Chem.* 2006, vol. 61, s. 382.
3. INES, P. A. , MORAISA, M. , RENATA, S. S. , TERESA, I.M.S.L., ANTÓNIO, O.S.S.R.: Use of a single air segment to minimise dispersion and improve mixing in sequential injection: turbidimetric determination of sulphate in waters, *Water Research*, 2003, vol. 37, s. 4243–4249.

Poďakovanie

Chcel by som sa poďakovať vedúcemu práce pánovi Ing. Františkovi Čachovi, PhD., za ochotnú spoluprácu a cenné rady pri riešení problémov.

Transformation of Lignin into Valuable Products and Their Market Price

Ludmila Hodásová, doc. Ing. Michal Jablonský, PhD.

*Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology,
Department of Wood, Pulp and Paper, Institute of Natural and Synthetic Polymers
Radlinského 9, 811 07 Bratislava, Slovakia
ludmila.hodasova93@gmail.com*

1 Introduction

Great discussion about alternative sources of chemicals and materials is opened today. Fossil fuels resources run low, therefore society is looking for substitute for oil in industry and production. Significant potential in this department has biomass, it is complex source with many modification possibilities and as renewable source it is optimal source of chemicals and energy. In comparison with fossil fuels biomass processing doesn't increase greenhouse gasses, it is also relatively cheap and easily accessible. Weight of dry biomass on the Earth is approximately $(1.85\text{--}2.4) \times 10^{12}$ tons. Biomass is from 75 % composed of saccharides and 20 % is made of biopolymer lignin¹.

This thesis is focused on lignin, as significant component of biomass. Lignin today fulfils mostly energetic function in cellulose-producing industry. However, lignin has great potential to be source of numerous chemicals including aromatic compounds or carbon materials such as carbon fiber.

2 Experimental

2.1 Extraction Processes

Lignin can be extracted from lignocellulose biomass in numerous ways. Type of extraction influences lignin's structure, purity and other properties such as polydispersity². Different types of lignin, their properties and some of the applications can be seen in the following table.

Table 1: Different types of lignin, their properties and possible applications²

Type of lignin	Mw (g/mol)	Polydispersity	Sulphur/ Ash (%/%)	Application
Soda lignin	1000–3000 (to 15000)	2.5–3.5	0/0.7–2.3	production of phenolic resins, animal nutrition, dispersants, polymer synthesis
Kraft lignin	1500–5000 (to 25000)	2.1–3.5	1.0– 3.0/0.5–3	fertilizer and pesticide carrier, carbon fibers, addition to thermoplastic polymers, binders, resins, activated carbon. Chemical - vanillin, hydroxylated aromatics, quinine, aldehydes and fatty acids
Hydrolysed lignin	5000– 10000	4.0–11.0	0– 1.0/1.0– 3.0	preparation of polymeric materials, dispersants, deflocculation agents
Organosolv lignin	500–10800	1–4.7	0.0/1.7	Additives for paints, varnishes, paints and create new substances
Lignosulfonates	1000– 50000 (to 150000)	4.2–7.0	3.5– 8.0/4.0– 8.0	colloidal suspensions, stabilizers, dispersants, binders, detergents, adhesives and components of feed, particle board, surfactants, adhesives and additives for cements
Ionic liquid lignin	≈2000		/0.6–2.0	chemicals
MWL	5500– 20000	1.8–2.5	0/1.5	Chemicals
Steam explosion lignin	107000– 19300	5.2–11.4		chemicals such as phenols or biodiesel
Lignin pyrolyses	620–1320	1.8–2.7		pyrolysis products, chemicals, liquid fuels

2.2 Lignin Modification

After extraction lignin can be used in different ways, as a macromolecule without modifications or it can be further modified. Lignin as molecule can be fragmentized or only functional groups can be subject of further modification³.

Fragmentation/Depolymerization

Lignin can be fragmentized into low molar mass compounds. There are many ways to break down lignin's macromolecule. Most significant fragmentation processes are together with products and their market prices displayed in Table 1.

Modification of functional groups

Hydroxyl, methoxyl, carbonyl and carboxyl groups are lignin functional groups. All of these can be modified to improve number of lignin's application possibilities².

Table 2: Fragmentation processes, their products and price range

Fragmentation methods	Product	Price [USD/MT]	Note
Pyrolysis	Acetic acid	350–750	*1,*2
	Phenol	1000–2000	*2,*3
	Methanol	350–500	*3,*4
	n-Propanol	1800–2300	*1
Oxidation	Vanillin	15–40 USD/kg	*1
	DMF	800–1000	*1
	DMSO	1–5 USD/kg	*1
	Syringic acid	10–100 USD/kg	*1
	4-Hydroxybenzaldehyde	9500–11100	*1
Microbial conversion	Vanillic acid	15–80 USD/kg	*1
	Ferulic acid	10–100 USD/kg	*1
	p-Coumaric acid	10–100 USD/kg	*1

*1 www.alibaba.com, *2 www.sunsirs.com, *3 www.apic2014.com, *4 www.methanex.com

2.3 Lignin Market Value

Lignin as part of renewable source has stable position on market. Prices of lignin differ depending on purity and extraction process. Therefore, they start as low as 50–280 USD/MT for low purity lignin, followed by Kraft lignin (260–00 USD/MT) and lignosulphonates (180–500 USD/MT). Soda lignin has price range from 200 USD/MT to 300 USD/MT. Lignin produced with organosolv process is priced from 280 to 520 USD/MT. Prices of lignins are closed with high purity lignin and price as high as 750 USD/MT^{1,4}.

2.4 Aromatic Compounds from Lignin

Aromatic compounds can be extracted from lignin using fragmentation processes. This lignin's ability has great potential in the future, due to the ability of production of chemicals such as benzene or phenol. Nowadays, these chemicals are produced from crude oil.

Benzene, Toluene, Xylene (BTX) – have great field of application. BTX makes 60 % of all aromatic compounds on market and 24 % of global petrochemical market. BTX fraction is usually used in material industry or some derivates are produced⁵.

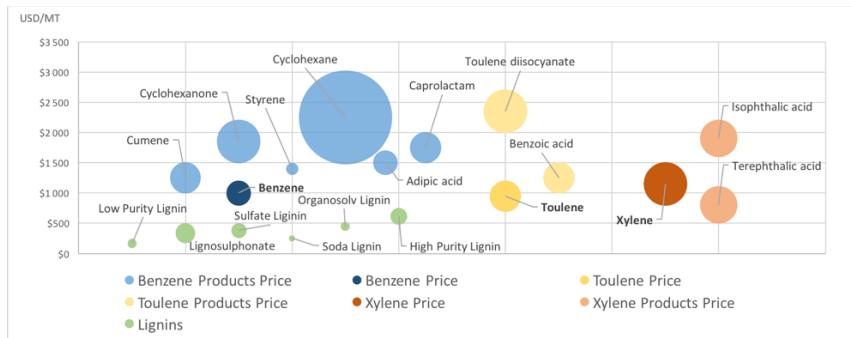


Figure 1: Comparison of price different products and lignins. Individual bubbles represent minimum and maximum price of compounds¹.

Phenol – mostly used in plastics production. Price range of phenol on market is approximately 1000–2000 USD/MT⁵. Production of phenol from lignin is welcome, because today phenol price depends on oil prices, but if produced from biomass, prices would stabilize. Phenol and derivates prices in comparison with lignin prices are shown in chart below.

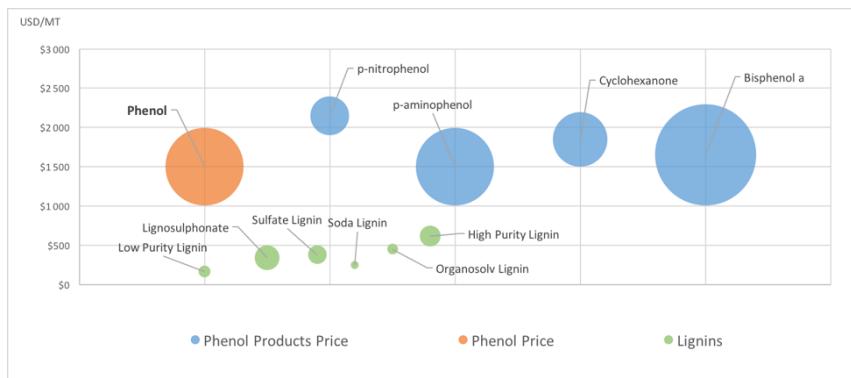


Figure 2: Price of phenol and its derivatives in comparison with lignin prices. Individual bubbles represent minimum and maximum price of compounds¹.

Vanillin – well known lignin oxidation product. It has been produced for almost 80 years, although only 20% of vanillin on market is product of lignin conversion. Most of it is produced from oil. Highest price, of course, has natural vanillin extracted from vanilla, about 600 000 USD/MT. Synthesized lignin has a little lower price, from 15–40 USD/kg.

2.5 Lignin as Macromolecule

Lignin does not have characteristics to be material itself.

Polymer blends – Lignin can be added to synthetic or bio-based polymers as polypropylene, polystyrene, polyethylene or natural rubber, to improve their properties. It is for example used as UV degradation stabilizer or thermo-oxidation stabilizer⁶.

Adsorbents – As a consequence of lignin's ability to adsorb heavy metal ions, there had been a fair amount of studies about lignin's application in wastewater purification. To this day we are aware that lignin can adsorb heavy metals such as chromium, cadmium, lead, zinc, nickel, mercury and cobalt⁶.

Hydrogels – These polymer-based networks are known to absorb thousands their weight of moisture. Thanks to numerous hydroxyl groups lignin could be efficient starting compound for their production. They have various applications in biological, biomedical or environmental field^{7,8}.

Phenol-formaldehyde resins – PF resins have been commercially used since the beginning of 20th century. Since then they have been used in various departments of industry, including construction, electronics or aerospace. Market value of PF resins is depending on purity or application field and starts at 1100 and goes to 2300 USD/MT¹.

2.6 Carbon Materials

From 50–60% is lignin made of carbon, thanks to this it can be precursor in carbon materials production.

Activated carbons – great adsorbents. Both organic and inorganic substances can be adsorbed and also in gaseous and liquid phase. They are characterized by surface area and size of pores; these properties also influence the price of activated carbons. Price range is from 500 up to 2500 USD/MT¹. Approximately 1500 USD/MT is price of activated carbon used for water purification. Prices may go very high with final products as carbon filters.

Carbon fiber – Lignin can replace polyacrylonitrile (PAN) as precursor for carbon fiber production¹. Prognosis say that by 2020 call for carbon fibers will reach 140 000 tons. Carbon fiber is extremely strong material with low density, what makes it very valuable in industry⁶. Still this material is too expensive, it is priced at 18–26 USD/kg¹.

2.7 Summary

Data obtained about different lignin prices and products prices are summarized in chart below. Bubbles in brown color represent prices of lignin produced with different extraction processes. Other bubbles represent important products and their derivates. From this comparison is noticeable which products would be efficient to focus on. For

example, PF resins can be produced from Soda lignin, where price of soda lignin is approximately 250 USD/MT and price of PF resins start from 1100 USD/MT⁹. High difference in price ranges indicates higher potential of production of these compounds or materials from lignin. Also carbon materials or phenol have high potential to be profitable. On the other hand, there is high probability that methanol produced from lignin would not make marketable product.

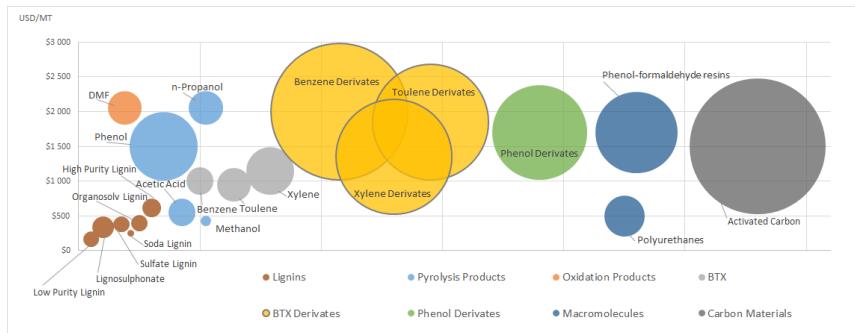


Figure 3:Price of lignins and potential products and their derivatives I. Individual bubbles represent minimum and maximum price of compounds¹.

Products with prices available only in USD/kg are displayed in chart below. These substances have probability to develop high profits. Differences in prices are very wide, and materials as carbon fibers belong to this category.

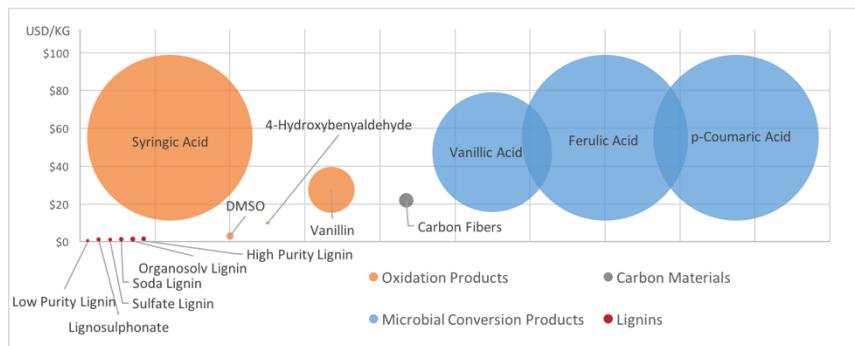


Figure 4: Price of lignins and potential products and their derivatives II. Individual bubbles represent minimum and maximum price of compounds¹.

4 Conclusion

Lignin is an appealing compound because of its aptness to be a biodegradable renewable source of energy and chemicals. Scientists, working in green chemistry department, are researching new methods and techniques for lignin's utility in material chemistry and overall industry. It is already known, that in some ways lignin can substitute fossil fuels, therefore it can be essential commodity in the future industry. Some applications already exist today, but these are not as efficient as future lignin applications could be.

5 References

1. Hodasova, L., Jablonsky, M., Haz, A. Lignin, potential products and their market value. *Wood research* 60 (6): accepted, 2015.
2. Jablonsky, M., Kočiš, J., Šuty, Š., Ház, A., Šurina, I., Vrška, M., Tiňo, R., 2014a: Fractionation and characterization of lignins as and efficient tools for their better valorization. *Wood, Pulp and Paper 2014, Polygrafia Academica 2014 – WPP a PA 2014*, Bratislava : Slovak chemical library, p. 206–211.
3. Laurichesse, L. Avérous, S., 2014: Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers, *Progress in Polymer Science*, 39(7): 1266–1290.
4. Gosselink, R. J. A., 2011: Lignin as a renewable aromatic resource for the chemical industry. PhD Thesis, Wageningen, NL, Wageningen University, 45 pp.
5. Smolarski, N., 2012: High-value opportunities for lignin: unlocking its potential Frost & Sullivan, Paris, 15 pp.
6. Lawoko, A., Duval, D., 2014: A review on lignin-based polymeric, micro- and nano-structured materials, *Reactive & Functional Polymers*, 85: 78–96.
7. Liang, X., Huang, Z., Zhang, Y., Hu, H., Liu, Z., 2013: Synthesis and properties of novel superabsorbent hydrogels with mechanically activated sugarcane bagasse and acrylic acid, *Polym. Bull.*, 70(6): 1781–1794.
8. Thakur M K, Thakur, V. K., 2015: Recent advances in green hydrogels from lignin: a review, *International Journal of Biological Macromolecules*. 72: 834–847.
9. Vishtal, A., Kraslawski, A., 2011: Challenges of industrial application of technical lignins, *BioResources*, 6 (3): 3547-3568.

Příprava a využití vybraných typů nanočástic v kosmetice

Bc. Julie Hoová

Vedoucí práce: prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Česká republika
xchoova@fch.vutbr.cz

1 Úvod

Jedním z největších nepřátel člověka je čas. Čas nelze zastavit, natož vzít zpět. Již od času Rudolfa II. se alchymisté snažili nalézt tzv. „elixír mládí“, který by zastavil projevy stárnutí. Doteď se však nepodařilo toužený elixír nalézt či vytvořit. Do komerčně prodávaných výrobků se proto začaly přidávat aktivní látky, které slibují oddálení vnějších příznaků stárnutí. Pro přenos těchto aktivních látek do míst určených se využívají například liposomy.

Liposomy jsou mikroskopické částice doprovázející aktivní látky hluboko do podkoží, kde jsou poté rozpuštěny v tucích¹. Složením se velice podobají lipidové dvojvrstvě buněčné membrány. Liposomy mohou být přidávány do gelů nebo emulzí. S rostoucí velikostí však klesá hloubka průniku do pokožky, jelikož jsou více náchylné k rozpadu².

Hlavní aktivní složkou působící na lidskou pokožku byl v této práci zvolen kofein. Kofein je látka zamezující hromadění tuků v buňkách. Nejvyšší hodnota absorpcie kofeinu přes lidskou pokožku se pohybuje kolem $2,24 \pm 1,43 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. Kofein má také silné antioxidační účinky, které pomáhají chránit buňky proti UV záření a které navíc zpomalují stárnutí pokožky. Také podporuje růst vlasů a inhibuje aktivitu enzymu 5-α-reduktasa, který zodpovídá za jejich vypadávání³.

Tato práce je zaměřena na přípravu liposomových částic, stanovení jejich enkapsulační účinnosti, stability a velikosti. Hlavní aktivní látkou, která byla enkapsulována, byl kofein. Jako další aktivní látky byly použity celkové polyfenoly a vitamin C. Aktivní látky byly získány z hrubých přírodních extraktů.

2 Metoda

Práce byla zaměřena na stanovení enkapsulační účinnosti kofeinu, celkových polyfenolů a vitamINU C získaných z přírodních extraktů, tedy bylo zkoumáno množství enkapsulované aktivní látky do připravených liposomů. Dále byla stanovena stabilita a velikost liposomových částic připravených pomocí vybraných tří metod, a to

ultrazvukovou metodou, ultrazvukovou metodou s přídavkem chloroformu a metodou odpařování na tenké vrstvě (TLE). Také byla pozorována dlouhodobá stabilita liposomových částic v modelových podmínkách.

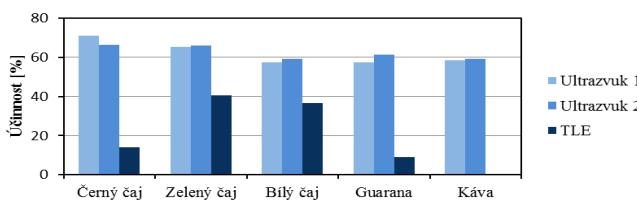
Jako zdroj kofeinu a celkových polyfenolů byly vybrány přírodní extrakty černého, zeleného a bílého sypaného čaje, dále kávy a guarany. Vitamín C byl získán přímo dezintegrací čerstvého ovoce, a to citronu, pomeranče a kiwi. K stanovení enkapsulační účinnosti kofeinu byla optimalizována metoda HPLC s PDA detektorem. Enkapsulační účinnost celkových polyfenolů byla stanovena pomocí UV-VIS spektrofotometrické metody s Folin-Ciocalteuvým činidlem a enkapsulační účinnost vitaminu C pomocí titrační metody s odměrným roztokem 2,6-dichlorindofenolem.

Na závěr byla z dosažených výsledků zvolena nejvhodnější aplikační forma do kosmetického produktu.

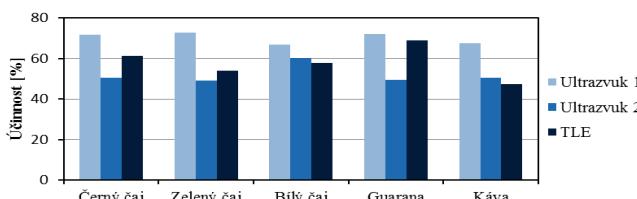
2.1 Enkapsulační účinnost aktivních složek

Liposomy byly připraveny třemi metodami. Jako aktivní složky byl sledován kofein, celkové polyfenoly a vitamin C. Enkapsulační účinnost aktivních látek byla vypočtena z rozdílu jejich koncentrace před a po enkapsulaci. Nejvyšší enkapsulační účinnost kofeinu bylo dosaženo při přípravě liposomů metodou využívající ultrazvuk (Obrázek 1).

Dále byly porovnávány enkapsulační účinnosti aktivních složek v případě přípravy liposomů s ko-enkapsulovanými extrakty kofeinu obohacenými o ovocnou složku s obsahem vitaminu C.



Obrázek 1: Srovnání enkapsulační účinnosti kofeinu extractů z přírodních zdrojů kofeinu



Obrázek 2: Srovnání enkapsulační účinnosti kofeinu ko-enkapsulovaných extractů z přírodních zdrojů a ovocných složek

Přídavek ovocné složky neovlivnil negativně enkapsulační účinnost kofeinu, naopak došlo v některých případech ke zvýšení jeho enkapsulační účinnosti. Nejvyšší

enkapsovala účinnost kofeingu byla stanovena u ko-enkapsulovaného roztoku černého čaje s přídavkem roztoku z citronu, a to až 71,79 % (Obrázek 2).

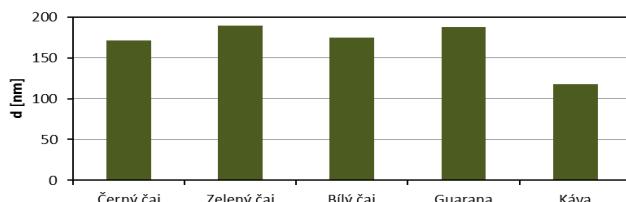
2.3 Velikost a stabilita liposomových částic

Stabilita připravených částic byla stanovena pomocí zeta potenciálu. Všechny získané hodnoty zeta potenciálu se nacházely mimo oblast nestability (-30 mV; 30 mV), proto lze liposomové částice brát za stabilní. Nejstabilnější byly částice s obsahem zeleného čaje (Tabulka 1).

Tabulka 1: Naměřené hodnoty zeta potenciálu

Extrakt kofeinu	ZP [mV]
Černý čaj	-49,00
Zelený čaj	-51,77
Bílý čaj	-47,47
Guarana	-37,00
Káva	-40,20

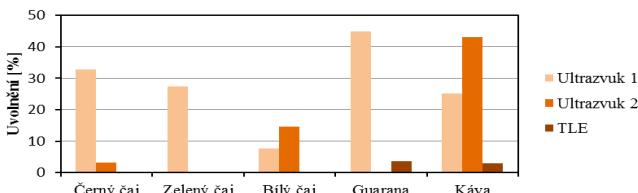
Velikost liposomových částic byla stanovena metodou měření za pomocí dynamického rozptylu světla. Jako nejmenší částice byly stanoveny liposomy s obsahem extraktu kávy, kde se jejich průměrná velikost pohybovala kolem 118 nm (Obrázek 3).



Obrázek 3: Srovnání velikostí částic jednotlivých extractů vytvořených ultrazvukovou metodou a stanovených metodou DLS

2.4 Dlouhodobá stabilita

Stabilita připravených liposomových částic a množství uvolněných aktivních složek byla sledována i z dlouhodobého hlediska. Připravené částice vykazovaly výbornou dlouhodobou stabilitu v modelových kosmetických prostředcích. První uvolněné množství aktivních složek bylo zaznamenáno až po 3. týdnu uchovávání (Obrázek 4). U vybraných částic nebylo uvolněné množství aktivních složek zaznamenáno ani po dvouměsíčním skladování. Částice jsou tedy dostatečně stabilní a vhodné pro aplikace do kosmetických přípravků.



Obrázek 4: Srovnání změny koncentrace kofeinu ko-enkapsulovaných extractů skladovaných po dobu 3 týdnů

2.5 Návrh kosmetického přípravku

Z dosažených výsledků byly jako nejvhodnější liposomy pro kosmetickou aplikaci zvoleny liposomy připravené pomocí ultrazvukové metody. Částice vykazovaly dobrou stabilitu a poměrně vysokou enkapsulační účinnost kofeinu. Ke zlepšení účinků kosmetického přípravku byly extrakty obohaceny o ovocnou složku a vzniklé směsi byly poté ko-enkapsulovány. Tímto krokem došlo ke zlepšení enkapsulační účinnosti kofeinu, celkových polyfenolů ale i vitaminu C. Také byla pozitivně ovlivněna dlouhodobá stabilita.

Ko-enkapsulované liposomy jsou tedy nejvhodnější aplikační formou z testovaných možností a mohou být použity do pleťové kosmetiky, zejména v pleťové vodě nebo gelu. Účinnější formou se jeví gel, jelikož jsou v něm částice stabilnější a gel navíc může obsahovat větší množství přidaných částic s aktivní složkou. S delší dobou působení na pokožce by docházelo i k vyššímu účinku.

3 Jednotky a značky

- µg – mikrogram
- cm – centimeter
- nm – nanometr
- h – hodina
- mV – milivolty
- Ultrazvuk 1 – ultrazvuková metoda
- Ultrazvuk 2 – ultrazvuková metoda s přídavkem chloroformu
- TLE – Thin Layer Evaporation, metoda odpařování na tenké vrstvě
- HPLC – High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- PDA – Photodiode array, fotodiodové pole
- UV – ultrafialová oblast
- VIS – viditelná oblast
- DLS – Dynamic Light Scattering, dynamický rozptyl světla

4 Závěry

Na závěr lze říci, že připravené liposomy s obsahem extraktů z černého, zeleného a bílého čaje, kávy i guarany jsou vhodné k aplikacím do omlazující kosmetiky. Navíc díky enkapsulaci testovaných kofeinových extractů obohacených o ovocnou složku bylo dosaženo zlepšení kvality a stability liposomů. Rovněž použitím těchto ko-enkapsulovaných liposomů lze případně dosáhnout i zlepšení vlastností samotného produktu. Účinkem kofeinu lze docílit převážně vyhlazení pleti. Přidáním ovocné složky lze pak pleť rozjasnit a dodat potřebnou pružnost a svěžest. Takto účinný přípravek je vhodný pro denní aplikaci. Nejvhodnější aplikační forma obsahující liposomy byla na základě výsledků této práce navržena pleťová voda nebo gel, používaný jako pleťová maska, který díky delší době působení na pokožce vykazuje i lepší účinek.

4 Literatura

1. Liposomy. 2009. *Celostní medicina* [online]. [cit. 2015-11-19] Dostupné z: <http://www.celostnimedicina.cz/>
2. FEŘTEKOVÁ, V. *Kosmetika v teorii a v praxi*. 3. rozšíř.vyd. Praha: MAXDORF, 2000, 336 s. ISBN 80-859-1219-8
3. HERMAN, A., HERMAN, A.P. Caffeine's Mechanisms of Action and Its Cosmetic Use. *Skin Pharmacology and Physiology* [online]. 2013, vol. 26, issue 1, s. 8–14 [cit. 2015-11-19]. DOI: 10.1159/000343174. Dostupné z: <http://www.karger.com/>

Tato práce byla podpořena projektem „Centrum materiálového výzkumu udržitelnost a rozvoj“ č L01211 (Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky). Také chci velmi poděkovat vedoucí práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. a konzultantce Ing. Petře Matouškové za pomoc s experimentální prací ochotu a hlavně za trpělivost.

STANOVENÍ PLATINOVÝCH KOVŮ VE VELKÝCH MĚSTSKÝCH AGLOMERACÍCH

Stanislav Ježek

Vysoké učení technické v Brně, fakulta chemická Purkyňova 464/118, 612 00 Brno
xcjezek@fch.vutbr.cz

Jedním z nejvýznamnějších znečišťení životního prostředí platinovými kovy je jejich použití v automobilových katalyzátorech. Povrch katalyzátorů je během používání chemicky, fyzikálně, rychlým střídáním redoxních podmínek, vysokou teplotou a mechanicky opotřebováván.

Toto opotřebení má za následek emisi platinových kovů do složek životního prostředí. Nejvyšší akumulace těchto kovů je v blízkosti silničních komunikací, převážně pak ve větších městských aglomeracích [1].

Chronické vystavení platinovým emisím může vést k platinose. Platinosa je alergická reakce projevující se kožní vyrážkou nebo poškozením dýchacích cest [2].

Negativní účinek palladia pocítí osoby citlivé na tento kov. Palladium vyvolává u těchto osob alergickou reakci již při nízkých dávkách. Alergie na palladium vyvolává podráždění očí a pokožky [3].

Experimentální část se skládá z odběru vzorků, rozkladu, prekoncentrování a následné vyhodnocení. Odběr vzorků probíhá na devíti odběrových místech na území města Brna. Za vzorky životního prostředí byly vybrány půdy, lišeňky a travní vegetace vyskytující se v blízkosti rušných dopravních tepen a křižovatek. Metoda pro použití lišeňíku byla zvolena „bag“ monitorovací technika. Lišeňík byl odebrán na nekontaminovaném místě a byl umístěn na vybrané lokality. K rozložení vzorků byla využita směs dvou kyselin. Koncentrované kyseliny dusičné a koncentrované kyseliny chlorovodíkové v poměru 1:3. Následná prekoncentrace byla provedena pomocí metody extrakce do tuhé fáze za použití modifikovaného silikagelu C18 [4]. Použitá metoda pro stanovení koncentrace platinových kovů ve vzorcích životního prostředí byla atomová absorpcní spektrometrie s elektrotermickou atomizací.

V současné době bylo provedeno měření na vzorcích půdy a travní vegetace. Bude následovat měření na vzorcích lišeňíků.

Z dosud zjištěných výsledků je patrné, že platinové kovy opravdu vstupují do složek životního prostředí. Emise výfukových plynů a tudíž i platinových kovů jsou deponovány na povrch vozovky a do nejbližšího okolí od komunikace. Z tohoto povrchu i z okolní vegetace a půdy se mohou dostávat pomocí dešťů do povrchových a následně podzemních vod.

S jistotou se dá tedy říci, že se zvyšující se automobilovou dopravou postupně narůstá také koncentrace těchto kovů v životním prostředí.

Velký vliv na množství uvolněných platinových kovů má také styl jízdy vozidel. Když je jízda plynulá uvolňuje se méně těchto kovů, naopak když se automobily rozjíždí nebo popojíždí stylem start-stop dochází k výrazně většímu uvolňování těchto kovů z katalyzátoru. Během plynulé jízdy nedochází k tzv. studených startů, které jsou právě charakteristické pro styl jízdy v centru města.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR ze specifického výzkumu č. FCH-S-15-2869 .

Literatura

1. SIKOROVÁ LUCIE, ROMAN LIČBINSKÝ A VLADIMÍR ADAMEC. PLATINOVÉ KOVY Z AUTOMOBILOVÝCH KATALYZÁTORŮ V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ. *Chemické listy*. 2011, (105): 361–366. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_05_361-366.pdf
2. TICHÝ, Miloň. *Toxikologie pro chemiky: toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativa*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 119 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0566-X.
3. KIELHORN, Janet, Christine RAVINDRA, Detlef KELLER a Inge MANGELSDORF. Palladium – A review of exposure and effects to human health: Environmental Pollution and Health Effects. *International Journal of Hygiene and Environmental Health[online]*. Elsevier, 2002, **205**(6): 417-432 [cit. 2015-06-29]. DOI:10.1078/1438-4639-00180.
ISBN 9780444522726. ISSN 14384639. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438463904701741>
4. KOMENDOVÁ-VLAŠÁNKOVÁ, Renata a Lumír SOMMER. Separation and Preconcentration of Platinum Group Metals and Gold on Modified Silica and XAD Sorbents in the Presence of cationic Surfactants for Their Determination by ICP-AES. *Collection of Czechoslovak Chemical Communication*. 2002, roč. 67, č. 4, s. 454–470.

Studium interakcí barviv s biopolymerem chitosanem

Pavel Kolesa

Martina Klučáková, Jiří Smilek

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Centrum materiálového výzkumu

Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Česká republika

xckolesa@fch.vutbr.cz

1 Úvod

Každý živý organismus je tvořen řadou více či méně složitých makromolekul, které lze souhrnně označit pojmem biopolymany. Jsou to látky, které tvoří podstatu fungování každého organismu. Z chemického hlediska se jedná o proteiny, nukleové kyseliny a polysacharidy. Všechny tyto látky nachází své uplatnění napříč všemi průmyslovými odvětvími, především pak ve farmaceutických aplikacích. Mezi tuto velice početnou skupinu látek patří i chitosan. Jedná se o lineární polysacharid, který se nejčastěji vyskytuje jako heteropolymer chitin + chitosan. Z hlediska chemického složení je chitosan částečně deacetylovaný *N*-acetyl glukosamin. Právě stupněm deacetylace a délkom řetězce (resp. molekulovou hmotností) se mohou jednotlivé vzorky chitosanu lišit.¹ Jak již bylo zmíněno, v přírodě se vyskytuje převážně jako heteropolymer s chitinem. Z toho také pramení jedna z možností průmyslové výroby. Konkrétně se jedná o *N*-deacetylace, kdy se na chitin působí koncentrovanou zásadou při teplotách dosahujících 100 °C. Chitin je po celulóze druhým nejrozšířenějším polysacharidem na zemském povrchu a tak jsou zásoby pro výrobu chitosanu prakticky nevyčerpateLNé. To proč je chitosan tak intenzivně zkoumán v nejrůznějších aplikacích je převážně způsobeno jeho biodegradabilitou a také biokompatibilitou. Tyto vlastnosti tvoří základní předpoklad pro jeho využití ve farmaceutickém průmyslu. To, že zájem o chitosan v posledních letech nebyvále roste, dokládá i nárůst počtu článků a patentů týkajících se právě chitosanu.²

V porovnání s chitinem vykazuje chitosan daleko větší reaktivitu. Tento fakt je způsoben přítomností aminoskupiny, která může být ve vodných roztocích protonizována a díky tomu je chitosan označován za kationaktivní biopolymer. Právě přítomnost aminoskupiny tvoří základní stavební kámen celého experimentu. Reaktivita chitosanu, resp. jeho aminoskupiny, může být zjištěna pomocí jednoduché laboratorní metody, jejímž studiem jsem se zabýval v předložené práci. Jedná se o difúzní metodu neustálenou difúzi v kyvetách. Cílem experimentu bylo zjistit, jaký je vliv pH prostředí na rychlosť difúze v hydrogelové matrici. Zjišťovaným parametrem byl efektivní difúzní koeficient. Základ použité metody tvořilo spektrofotometrické monitorování koncentrace modelových sond (dvou vybraných anionaktivních azobarviv) v kyvetě v závislosti na čase a různých vzdálenostech od rozhraní hydrogel-roztok. Difúzní experiment byl

realizován v hydrogelových matricích na bázi termoreverzibilní agarózy. Výhodou využití agarózy je dobrá optická průchladnost a současně nízká afinita k interakcím jak s kationaktivním chitosanem, tak anionaktivními barvivy. Při použití těchto gelových systémů v kombinaci s difúzními experimenty, získáváme velice účinný, avšak jednoduchý nástroj pro stanovení difúzních koeficientů látek.

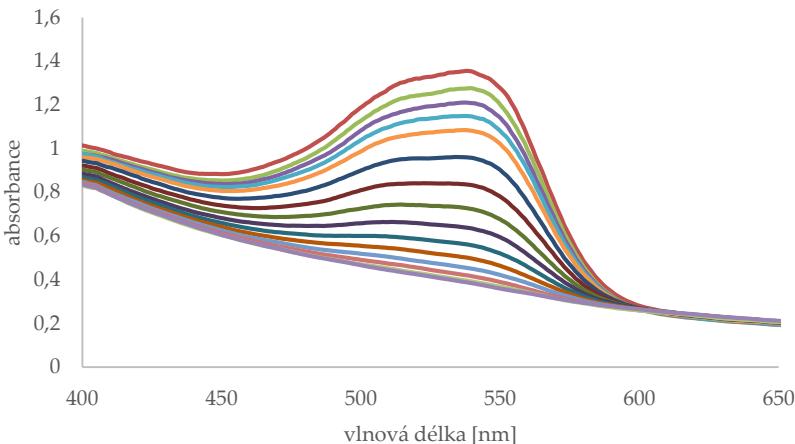
2 Experimentální část

2.1 Materiály

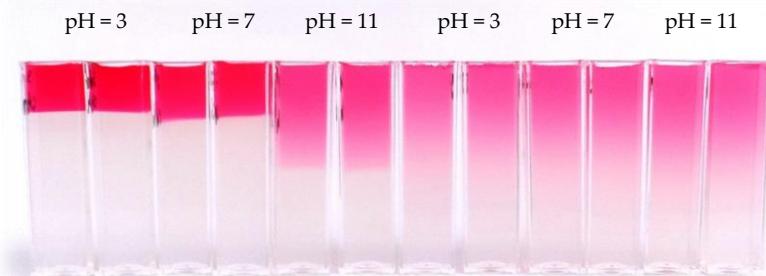
Agaróza (≤ 10 hm. % vlhkosti), chitosan (75–85 % deacetylovaný), 95% kyselina octová, hydroxid sodný i barviva Chicago blue (C.I. 24 410) a Saturnová červeň (C.I. 35 780) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich®. Na přípravu pufrů o různých hodnotách pH byly navíc ještě použity: dihydrát monohydrogenfosforečnanu disodného, dihydrogenfosforečnan sodný a kyselina citronová. Jak již bylo zmíněno v úvodu, cílem předložené práce bylo zjistit, jaký vliv má změna pH prostředí na průběh difúze. Proto bylo zapotřebí z výše popsanych chemikálií připravit pufrační roztoky a to o $pH = 3$, $pH = 7$ a $pH = 11$. Navážky obou barviv byly rozpuštěny právě v těchto roztocích, přičemž výsledná koncentrace Chicago blue byla $0,01\text{ g dm}^{-3}$ a koncentrace Saturnové červeně $0,04\text{ g dm}^{-3}$. Roztok chitosanu byl připraven rozpuštěním navážky $0,010\text{ g}$ chitosanu v 50 ml 5 hm. \% roztoku kyseliny octové a míchán po dobu 24 hodin. Následně bylo pH roztoku upraveno pomocí 2M hydroxidu sodného na $pH = 7$ a objem byl doplněn vodou na 100 ml . Před samotným měřením bylo nutné stanovit kalibrační křivky obou barviv v 1 hm. \% agarózovém gelu a to zvlášť pro každé pH. Hydrogely pro difúzní experiment byly připraveny z roztoku obsahujícího stejně množství agarózy (1 hm. %), ale rozdílná množství chitosanu (0 hm. % a $0,001\text{ hm. \%}$). Takto vzniklé roztoky byly zahřívány za stálého míchání na teplotu $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ a ihned nality do plastových UV-VIS kyvet (PMMA, vnitřní rozměry [mm]: $10 \times 10 \times 45$). Po 45 minutách došlo uvnitř kyvety k vytvoření hydrogelu. Následně byly kyvety umístěny do difúzních nádob obsahujících 250 ml roztoku každého z barviv o příslušném pH. Barviva v difúzních nádobách byla míchána při 250 ot. Min^{-1} . Difúzní nádoby byly po celou dobu experimentu (72 hodin) umístěny při konstantní teplotě $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2 Metody

Při samotném měření byly kyvety v časových intervalech 24, 48 a 72 hodin proměřovány pomocí UV-VIS spektrofotometru Varian Cary-50. Díky vertikálně polohovatelnému nástavci bylo možné kyvety proměřovat v různých polohách od 3 mm od rozhraní hydrogel-vzduch až po 38 mm od tohoto rozhraní. Od polohy 3 mm až po 8 mm od rozhraní byla absorpcní spektra měřena vždy po 1 mm. Od hodnoty 8 mm od rozhraní již byla spektra měřena po 2 mm až do místa, kde již nebyl patrný výskyt barviva. Byla tedy získána komplexní spektra (Obrázek 1) v celé délce kyvety, kde byl měřitelný výskyt barviva. Tímto způsobem byly proměřeny obě barviva při všech studovaných hodnotách pH.



Obrázek 1: Spektra odpovídající různým vzdálenostem od rozhraní hydrogel-roztok po 72 h pro barvivo Saturnová červeň



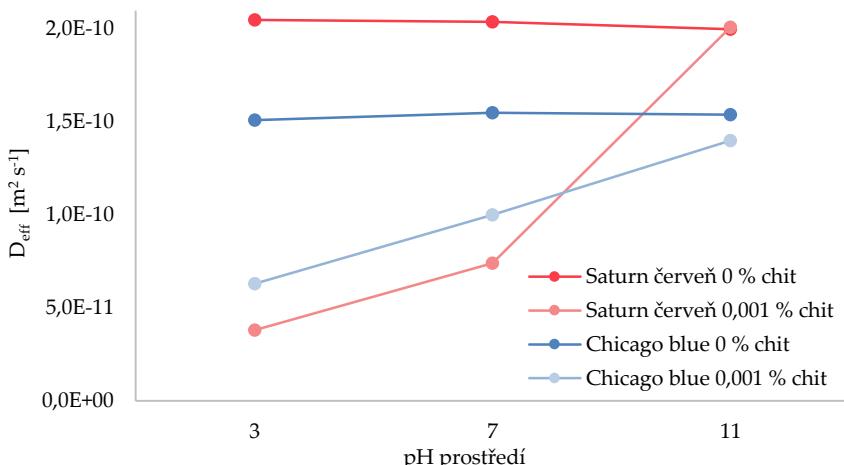
Obrázek 2 Kyvety s hydrogelem po 72 hodinách v roztoku Saturnové červeně o rozdílném pH (zleva 6 kyvet s koncentrací chitosanu 0,001 hm. %, zbyvajících 6 kyvet bez přídavku chitosanu)

2.3 Výsledky a diskuse

Důležitým zkoumaným parametrem, ze kterého měl být usuzován vliv pH prostředí na proces difúze, je efektivní difúzní koeficient, jakožto parametr rychlosti difúze barviva do struktury hydrogelu. Vyhodnocením experimentálních dat bylo zjištěno, že pH prostředí výrazným způsobem ovlivňuje rychlosť difúzního procesu a to u kyvet s přídavkem chitosanu.

Jak již bylo zmíněno v úvodu, chitosan je díky přítomnosti aminoskupiny označován za kationaktivní biopolymer. Právě aminoskupina chitosanu může být protonizována a díky tomu interaguje se záporně nabité sulfonovou skupinou použitých barviv. Díky této interakci elektrostatického charakteru pak dochází ke zpomalování průniku barviva do struktury hydrogelu. Aminoskupina chitosanu je charakterizována hodnotou

$pK_a = 6,5$. S rostoucí hodnotou pH tak bude docházet k tomu, že stále menší počet aminoskupin bude protonizován a tudíž schopen interakce se sulfonovou skupinou azobarviv. Naopak při kyselejším pH bude docházet k výše zmíněným elektrostatickým interakcím a vzniku $-NH_2SO_3^-$ respektive $=NH^+SO_3^-$.³ Z následujícího grafu (Obrázek 3) je zřejmé, že s klesající hodnotou pH dochází k výraznému snížení efektivního difúzního koeficientu u kyvet s přídavkem chitosanu. Naopak u kyvet bez přídavku chitosanu, tvořené pouze 1 hm. % agarovým gelem, prakticky nedochází k ovlivnění difúze vlivem pH prostředí. Dále je patrný rozdíl v reaktivitě obou barviv. Je zřejmé, že Saturnová červeň o použité koncentraci interaguje s chitosanem daleko výrazněji, než je tomu v případě barviva Chicago blue.



Obrázek 3 Závislost efektivního difúzního koeficientu na pH prostředí

Naměřená data ze spektrofotometru byla dále zpracována pomocí programu Origin 8. Zde se díky přednastavené funkci absorpční spektra vyhlaďila, aby nedocházelo k chybám vzniklých špatnou interpretací dat.

Z naměřených dat lze získat difúzní koeficienty proložením experimentálně stanoveného koncentračního profilu teoretickým modelem funkce, která vznikla matematickou úpravou Fickových zákonů. Matematický model:

$$c = c_0 \cdot erfc \frac{x}{\sqrt{4D_{eff} t}} \quad (1)$$

kde c je koncentrace difundující látky, c_0 je koncentrace látky na fázovém rozhraní, x je difúzní dráha, D difúzní koeficient látky, t je čas difúze a ERFC je chybová funkce.⁴ Proložení se provádí metodou nejmenších čtverců. Proložení experimentálně stanovených koncentrací teoretickou funkcí dle rovnice výše bylo realizováno pomocí přídavné funkce Řešitel v MS Excel.

V tabulce níže (Tabulka 1) jsou znázorněny vypočtené hodnoty difúzních koeficientů i koncentrací barviva na rozhraní hydrogel-roztok pro barvivo Saturnová červeň a Chicago blue.

Tabulka 1 Difúzní koeficienty pro hydrogely s přídavkem chitosanu i bez přídavku chitosanu v závislosti na hodnotě pH prostředí

pH prostředí	$D_{eff} \cdot 10^{10}$ [m ² s ⁻¹]	
Chicago blue 0,01 g dm⁻³		
	0,000 hm. % chitosanu	0,001 hm. % chitosanu
3	1,51 ± 0,05	0,63 ± 0,08
7	1,55 ± 0,07	1,00 ± 0,05
11	1,54 ± 0,10	1,40 ± 0,13
Saturnová červeň 0,04 g dm⁻³		
	0,000 hm. % chitosanu	0,001 hm. % chitosanu
3	2,05 ± 0,12	0,38 ± 0,03
7	2,04 ± 0,10	0,74 ± 0,04
11	2,00 ± 0,12	2,01 ± 0,20

4 Závěr

Reaktivita biopolymerů může být stanovena mnoha experimentálními postupy. Avšak výše zmíněná difúzní metoda „neustálená difúze v kyvetách“ se jeví jako jednoduchý nástroj pro rychlé stanovení reaktivity řady látek. Tento experiment navazuje na předchozí práce, kdy byl zkoumán např. vliv teploty na rychlosť difúze v agarózovém gelu s přídavkem chitosanu. Doplňuje a poskytuje ucelený pohled na reaktivitu chitosanu a umožňuje tak lépe porozumět jeho chování v různých systémech. Obecně lze říci, že studium reaktivity nejen biopolymerů, ale i řady dalších látek za použití hydrogelových matric přináší nespočet výhod. Těmi může být např. příprava matric o definované velikosti a tloušťce, vhodně zvolená velikost pórů matrice atd. Při použití těchto gelových systémů v kombinaci s difúzními experimenty, získáváme velice účinný, avšak jednoduchý nástroj pro stanovení difúzních koeficientů látek. I přesto, že je prozatím ve fázi optimalizace, jeví se neustálená difúze v kyvetách jako vhodný nástroj pro studium reaktivity řady dalších biopolymerů. Díky jednoduchým difúzním technikám je možné stanovit základní difúzní charakteristiky s odchylkou menší než 10%. Díky vysokému obsahu vody v hydrogelu, je schopen simulovat podmínky pro použití např. ve farmacii. Výsledky získané pomocí difúzních procesů prováděných v kyvetách budou v budoucnu porovnány i s jinými jednoduchými difúzními technikami (sorpční experimenty, difúzní cely).

5 Literatura

1. KHOR, Eugene. Chitin: a biomaterial in waiting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* [online]. 2002, vol. 6, issue 4, s. 313–317. DOI: 10.1016/S1359-0286(02)00002-5.
2. VAVŘÍKOVÁ, Eva a Jarmila VINŠOVÁ. Chitosan and Its Pharmaceutical Applications. In: *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2009. ISSN 0009-2770. RAVI KUMAR, Majeti N.V. A review of chitin and chitosan

- applications. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2000, vol. 46, issue 1, s. 1–27. DOI: 10.1016/S1381-5148(00)00038-9.
3. ZHENG, Liuchun, Chenggang WANG, Yuehong SHU, Xiaomin YAN, Laisheng LI a Véronique PRÉAT. Utilization of diatomite/chitosan–Fe (III) composite for the removal of anionic azo dyes from wastewater: Equilibrium, kinetics and thermodynamics. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2015, vol. 468, č. 244, s. 129–139. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2014.12.015
 4. CRANK, John. *The mathematics of diffusion*. 2nd ed., 1st publ. in paperback 1979. Oxford: Oxford University Press, c1975, viii, 414 s. Oxford science publications. ISBN 978-0-19-853411-2.

Influence of Silver Nanoparticles on 2D and 3D imaging of porous collagen scaffolds

Zuzana Konecna

Lucy Vojtova, Jan Zidek, A. M. Abdel Mohsen, Tomas Zikmund, Jana Brtnikova, Jiri Chmelik, Roman Jakubicek, Lukas Zubal, Jiri Jan and Josef Kaiser

*Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Department of Material Chemistry
Purkynova 112, 61200 Brno, Czech Republic
xckonecnaz@fch.vutbr.cz*

1 Introduction

Collagen is biocompatible and biodegradable protein used in tissue regeneration as cell and drug carriers (scaffolds) in the form of porous sponges, thin sheets or gels. Thanks to the chemical composition and fibrillary structure, collagen has the right properties for use in tissue regeneration, such as pore structure, permeability and hydrophilicity. Therefore, collagen scaffolds are ideal substrate for cells, such as osteoblasts and fibroblasts. Once inserted, those types of cells can grow as much as they do in normal tissue¹.

To tailor suitable scaffolds for certain application, its morphology is a very important characteristics of the 3D porous structure, as the porosity and pore interconnectivity is particularly important for the distribution of nutrients throughout the cell-seeded scaffold. To have the optimum pore size is the key aspect for successful cell seeding as well as cell migration from patient into the scaffold, cell proliferation and subsequent differentiation.

Morphology of porous scaffolds are commonly observed using scanning electron microscopy (SEM), which unfortunately provides only a two-dimensional image of the sample surface and does not determine the morphology of the entire volume. Suitable method for visualization of three-dimensional scaffold structure appears to be X-ray computed tomography (CT), which provides a non-destructive way to obtain information about pore size and interconnectivity³⁻⁵.

To improve contrast of soft biomaterials images, numerous staining agents can be used. Frequently reported pigments are compounds with heavy atoms (like Osmium). Recently, nanoparticles are being used to enhance the contrast, mainly in the core-shell form to suppress the aggregation and unequal distribution.

Alternative technique of surface treatment by “in-situ” formed nanoparticles was proposed by our research group. The “in-situ” nanoparticle formation has so far been described for gold and platinum, however not for the purpose of increasing the biopolymer scaffold contrast in CT. The staining by ceramic hydroxyapatite microparticles (HAp), silver ions (Ag^+) and silver nanoparticles (AgNPs) is discussed in this paper.

2 Experimental

2.1 Scaffold preparation

Pure collagen, hydroxyapatite and Ag modified scaffold were prepared according to a previously described method². Bovine collagen type I (VUP Medical, Brno, CZ) was used for the preparation of freeze-dried 3D porous scaffold. For the HAp modified scaffold, hydroxyapatite in the form of microparticle powder was added in 1:1 weight ratio. Subsequently, these scaffolds were stabilized by treating with N-(3-dimethylamino propyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS), (Sigma Aldrich, Germany). Before their use, scaffolds were purified from unreacted chemicals by washing with $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ followed by distilled water and lyophilized.

Silver modified collagen scaffolds were treated either with silver ions (Ag^+) or with “in-situ” prepared silver nanoparticles (AgNPs). Ag^+ in sample was formed using silver nitrate and AgNPs were formed by “in-situ” reduction from Ag^+ solution within the scaffold preparation. Using our technique, the nanoparticles are form directly along with the scaffold structure, homogeneously covering all collagen fibers in the entire sample volume.

2.2 X-ray computer tomography

The data to be processed have been acquired using a GE Phoenix v|tome|L240 computed tomography system equipped with a 180 kV/15W high-power nanofocus X-ray tube and at panel GE DXR detector array (2048×2048 pixel, $200 \times 200 \mu\text{m}$ pixel size).

The μCT scan was carried out in an air-conditioned X-ray cabinet at 21 °C. The samples were fixed in a plastic tube with an inner diameter of 1.8 mm. The voxel resolution obtained depended on the sample length. For one scan, images at 2200 angles per 360° were measured. The tomographic reconstruction was done with adatos|x 2.0 3D computed tomography software.

2.3 Scanning electron microscopy

The morphology of the lyophilized cross-linked collagen scaffolds was observed with scanning electron microscopy MIRA 3 (Tescan Brno, CZ) (SEM). 2D SEM images of the cut porous material accurately capture the scanned surface and serve as a reference pictures for comparison with a 3D model. The samples were sputter-coated with a 20 nm layer of gold prior to analysis. The optimum magnification to observe several pores and eliminate strong fisheye effect was kept in a range of 80-1500x.

4 Conclusions

Main focus of this work was to qualitatively and realistically visualize 3D structure using different staining agents and compare the results with 2D imaging.

The reference material without any treatment, pure collagen (Coll), was compared to three other samples treated with staining agents. One set of samples was treated with inorganic particles like hydroxyapatite microparticles (Coll/HAp) and silver nanoparticles (Coll/Ag-NPs) in order to see the influence of composition. Moreover, two specimens (Coll/Ag⁺and Coll/Ag-NPs) stained with silver were included in order to see the effect of either ions or nanoparticles on a structure with the same composition and concentration of staining agent. The samples were scanned separately. Next, they were scanned together in order to apply the same acquisition conditions for each sample. SEM images of all four types of prepared porous collagen scaffolds are shown in Figure 1.

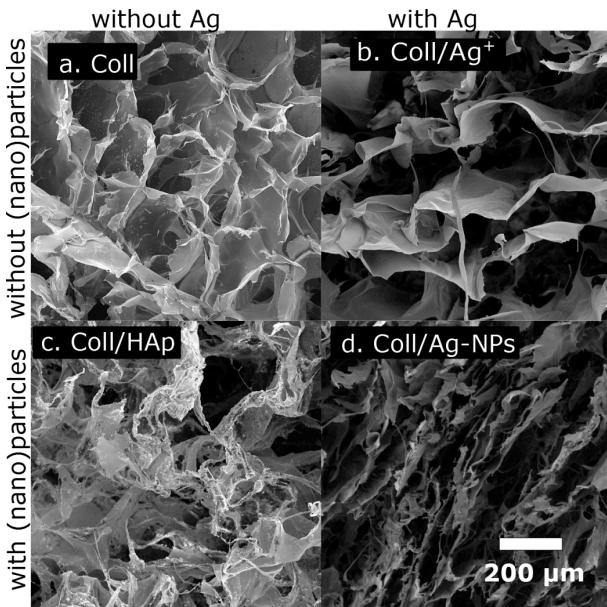


Figure 1: The images from scanning electron microscopy (SEM): a. Pure collagen scaffold (Coll); b. Collagen with silver ions (Coll/Ag⁺); c. collagen with hydroxyapatite particles (Coll/ Hap); d. Collagen and silver nanoparticles (Coll/Ag-NPs).

Electron microscopy also showed to be valuable in terms of visualizing the particle size and distribution (Figure 2), qualities that are impossible to obtain from CT measurement.

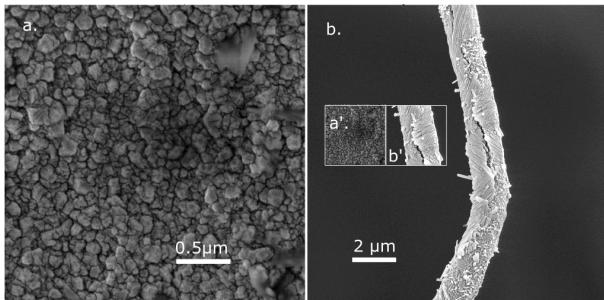


Figure 2: Sample Coll/Ag-NPs in magnification showing homogeneous continual surface of Ag-NPs on the collagenous sheets a. and fibrils b.; insets of both pictures a', b'.in equal scale.

Figure 3 shows 3D structure of pure as well as all three different stained collagen scaffolds. The best visualization was seen when silver nanoparticles were used. The collagen sample with Ag nanoparticles shows parts of the scaffold which are invisible in pure collagen. Also the addition of hydroxyapatite (HAp) particles can increase the visibility of the scaffold on CT.

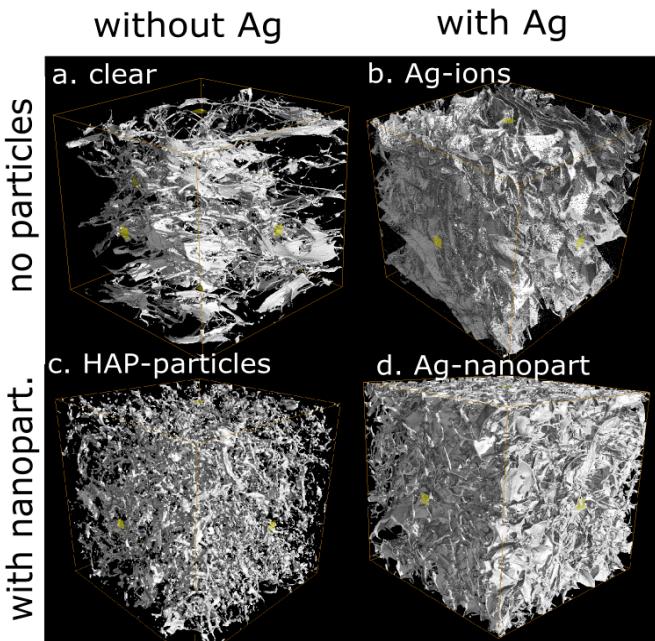


Figure 3: Scaffold structures with different staining agents obtaines by X-Ray computed tomography (CT): a. Pure collagen scaffold (Coll); b. Collagen with silver ions (Coll/Ag+); c. collagen with hydroxyapatite particles (Coll/ Hap); d. Collagen and silver nanoparticles (Coll/Ag-NPs).

However, the pattern of the sample with HAp is different from the pattern of pure collagen due to the HAp micro-size (approx. 30 μm) being bigger than μCT resolution (about 1 μm). It means that obtaining a good visualization does not depend on composition, but the particle size. Important seems to be comparison of similar sized nanoparticles from different inorganics (e.g. HAp and Ag), which is being currently prepared and studied.

Influence of silver nanoparticles is clearly visible when applying higher threshold intensity on the grey shade scale, showed on Figure 4.

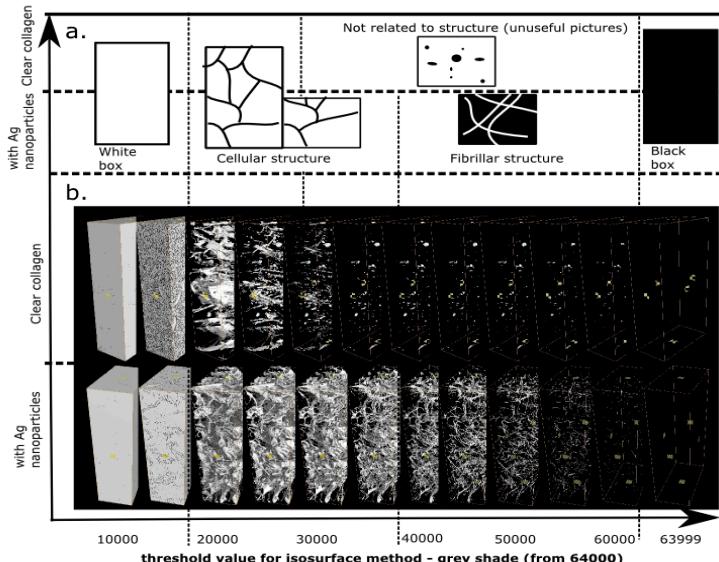


Figure 4: Influence of threshold value on the visualization of μCT scans. Visualization by isosurface method with different threshold.

For realistic image, right value of threshold needs to be applied. Too low threshold value leads to higher noise and too high value leads to an incomplete image.

We propose staining of collagen scaffold with in-situ formed Ag nanoparticles having homogeneous distribution on the scaffold's surface. The criterion of successful visualization was a similarity of a 3D model with pictures from microscopy, generally accepted knowledge and our previous findings about scaffold structure. The resulting 3D model was realistic, when we investigated the structure of the scaffold. It could be used for qualitative comparison of the morphology of porous scaffold. The final structure is ready for further investigation of collagen scaffolds like pore size distribution, and stem cells growth within the scaffold.

5 References

1. Oliveira, S. M.; Ringshia, R. A.; Legeros, R. Z.; Clark, E.; Yost, M. J.; Terracio, L.; Teixeira, C. C. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2010, 94A, 371–379.
2. Prosecka, E.; Rampichova, M.; Litvinec, A.; Tonar, Z.; Kralickova, M.; Vojtova, L.; Kochova, P.; Plencner, M.; Buzgo, M.; Mickova, A.; Jancar, J.; Amler, E. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2015, 103, 671–682.
3. Oliveira, A. L.; Malafaya, P. B.; Costa, S. A.; Sousa, R. A.; Reis, R. L. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2007, 18, 211–223.
4. Moore, M. J.; Jabbari, E.; Ritman, E. L.; Lu, L.; Currier, B. L.; Windebank, A. J.; Yaszemski, M. J. *Journal of Biomedical Materials Research* 2004, 71A, 258–267.
5. Mather, M. L.; Morgan, S. P.; White, L. J.; Tai, H.; Kockenberger, W.; Howdle, S. M.; Shakesheff, K. M.; Crowe, J. A. *Biomedical Materials* 2008, 3, 015011.

The authors acknowledge European Regional Development Fund (CEITEC, CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

Problematika stanovení betablokátorů v povrchových vodách

Autor: Juraj Košík

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

Vysoké učení technické v Brně

Fakulta chemická

Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí

Purkyňova 464/118, 612 00 Brno

xckosikj@fch.vutbr.cz

1 Úvod

Předložená bakalářská práce se zabývá problematikou neustále se zvyšující koncentrace léčiv v životním prostředí. Mezi často používané medikamenty patří β -blokátory, které jsou jednou z hlavních indikačních skupin léků v kardiologii. U této skupiny léčiv byly prokázány toxicke účinky na vodní organismy^{1,2}. Jsou to klinicky důležité léčiva často používaná k léčbě kardiovaskulárních onemocnění, jakými jsou hypertenze, arytmie a anginy pectoris. Je důležité sledovat koncentrace β -blokátorů ve vodním ekosystému, vzhledem k akutní a chronické toxicitě těchto látek, kterou vykazují vůči vodním organismům. Tato práce je zaměřena na vypracování a optimalizaci analytické metody pro stanovení těchto látek. Sledovými matricemi byla povrchová voda z dvou řek, Váhu (SR) a Dyje (ČR) a odpadní voda z velkokapacitní čistírny odpadních vod (ČOV) Brno-Modřice. Analyty byly ze vzorků vod izolovány pomocí extrakce tuhou fází (SPE). Pro finální analýzu byl použit ultra-vysokoúčinný kapalinový chromatograf (UHPLC) s UV-VIS detekcí pomocí diodového pole (DAD). Za cílové analyty byly vybrány atenolol, metoprolol a propranolol.

2 Experimentální část

2.1 Sympatolytika

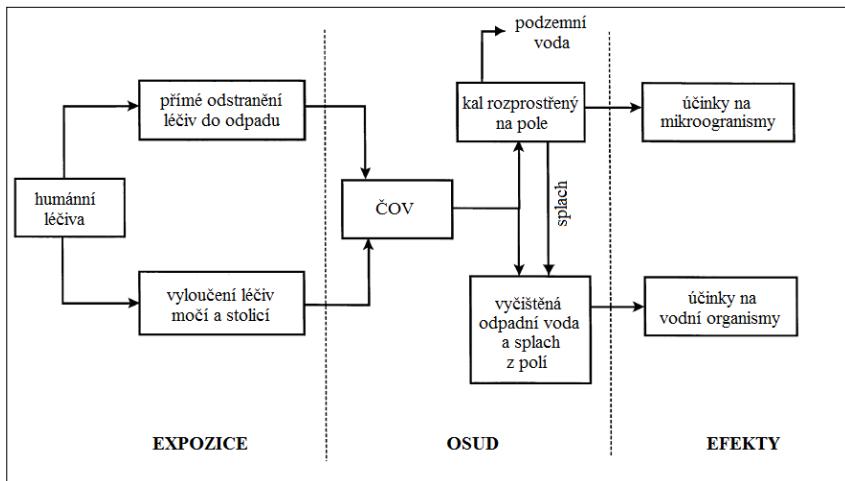
Sympatolytika, antagonisté (blokátory) adrenergních receptorů jsou farmaka, která blokují adrenergní reakce. Jsou to látky působící buď přímo na adrenergní receptory, případně nepřímo ovlivněním dějů v nervovém zakončení. Svým účinkem proto inhibují adrenergní reakce vyvolané sympathomimetiky nebo stimulaci sympatiku.

Sympatický nervový systém ovlivňuje funkce všech vnitřních orgánů a systémů organismu a za stresových stavů napomáhá udržet homeostázi organismu. To, co je v akutním stavu účelnou reakcí, např. vazokonstrikce a redistribuce krve k udržení perfuze životně důležitých orgánů, působí při delších trvání na organismus nepříznivě. Dlouhodobá aktivace sympatiku se negativně odráží zejména tam, kde je účinek sympatiku nevýznamnější, tj. v kardiovaskulárním systému, a je spojována s rozvojem řady závažných onemocnění (např. hypertenze). Proto mají sympatholytika, a to především β -blokátory, velmi významné postavení v terapii prakticky všech kardiovaskulárních onemocnění^{3,4}.

2.2 Osud léčiv v životním prostředí

Osud léčiv v životním prostředí závisí zejména na jejich fyzikálně-chemických a biochemických vlastnostech, na jejich množství prokazovaném ve složkách životního prostředí a na mnoha dalších faktorech. Proto je velice obtížné určit přesný osud jednotlivých léčiv v ekosystému. Je však možné popsat jejich předpokládané cesty vstupu do ekosystému a jejich další osud (Obrázek č. 1).

Největší část léčiv, jak již bylo zmíněno, se do odpadních vod dostává močí nebo stolicí. Značná část farmak se do kanalizace dostává i přímo, a to při neodborné likvidaci nespotřebovaných léků. Kanalizačním systémem pokračují do ČOV, kde je jejich část přítomními mikroorganismy degradována, a to až na oxid uhličitý a vodu. Lipofilní léčiva, která degradaci poléhají jen stěží, zůstávají v aktivovaném kalu. Zbytek hydrofobních farmak je metabolizován na hydrofilnější formy, které však stále zůstávají odolné vůči mikrobiální degradaci. Tyto látky jsou v tomto případě rozpuštěné ve vodě a pokračují s vyčištěnou odpadní vodou až do vod povrchových. Zde může docházet k účinkům na vodní organismy.



Obr. 1: Osud léčiv v životním prostředí⁵

2.3 Analýza léčiv

Standardní operační postup (SOP), který je všeobecně používaný při stanovení léčiv ve vodním ekosystému, obsahuje tří hlavní kroky. Jsou to:

- **vzorkování** – představuje vlastní odběr vzorku, jeho případné zakonzervování a transport do laboratoře
- **extrakce** – zakoncentrování a přečištění extraktu získaného ze vzorku
- **analýza** – prováděná vhodnou instrumentální metodou.

2.4 Kapalinová chromatografie, HPLC a UHPLC

Kapalinová chromatografie se využívá zejména tam, kde nelze použít plynovou chromatografii, tj. při separaci netěkavých, málo těkavých a termicky labilních sloučenin, což je asi 80 % sloučenin. Používají se různé systémy kapalné mobilní fáze a pevné, případně kapalné stacionární fáze. Hlavním faktorem ovlivňujícím separaci jednotlivých složek směsi je povaha mobilní fáze. Proto je velice důležité, a to na základě vlastností separovaných látek, vybrat vhodné rozpouštědlo, případně směs rozpouštědel.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie neboli HPLC (High Performance Liquid Chromatography) je separační metoda, kde jsou používány kolony s vhodnou stacionární fází, většinou o velmi malých částicích (3 až 10 µm), a to k dosažení rychlé separace s vysokým rozlišením zón separovaných složek [6, 7, 8].

V ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografii (UHPLC, Ultra-High Performance Chromatography) je velikost používaných částic obvykle v rozmezí od 1,5 do 2 µm. Kolony mají délku 50 až 150 mm a vnitřní průměr většinou 2,1 mm. Uspořádání UHPLC přístroje je velice podobné uspořádání HPLC.

3 Experimentální část

3.1 Extrakce

Ihned po transportu do laboratoře byly vzorky přefiltrovány pomocí vysokotlakého filtračního zařízení přes kruhové papírové filtry. Následně byla provedena extrakce tuhou fází (SPE) na kolonkách Oasis HLB (60 mg) od firmy Waters, USA a na kolonkách SupelTM-Select HLB (60 mg) od firmy Sigma-Aldrich, Německo. V případě povrchové vody a odpadní vody odebrané na odtoku z ČOV byl pro extrakci použit objem 200 ml, v případě odpadní vody z přítoku na ČOV pouze objem 100 ml.

Optimalizovaný postup SPE je uveden v Tabulce 1. Kolonky byly nejprve aktivovány pomocí 5 ml methanolu a 5 ml milli-Q vody. Následně byl na kolonku kvantitativně nanesen vzorek.

Tabulka 1: Použitý postup SPE

Aktivace sorbentu	5 ml methanolu, 5 ml milli-Q vody
Nanesení vzorku	200 ml povrchové/odpadní vody
Promytí	5 ml milli-Q vody, 1 ml 5 % methanolu v milli-Q vodě
Sušení	proudem vzduchu 20-25 min
Eluce	2 × 4 ml methanolu

3.2 Finální analýza

Finální analýza β -blokátorů v přečištěném extraktu byla provedena metodou kapalinové chromatografie. Pro měření byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf (UHPLC) Agilent 1290 Infinity. K samotné separaci docházelo na koloně ZORBAX Eclipse Plus C18 s velikostí částic 1,8 μm od firmy Agilent, USA. Analyty byly detekovány pomocí diodového pole. V Tabulce 2 jsou uvedeny optimální chromatografické podmínky.

Tabulka 2: Optimální chromatografické podmínky

Nástrík	2 μl
Teplota kolony	35 °C
Mobilní fáze	10 mM KH ₂ PO ₄ pufr (pH = 3) + acetonitril
Průtok mobilní fáze	0,3 ml/min
Typ eluce	gradientová
Vlnová délka	224 nm

3.3 Reálné vzorky povrchových vod

Zjištěné hodnoty koncentrací β -blokátorů ve vzorcích povrchových vod jsou zobrazeny v Tabulce 3.

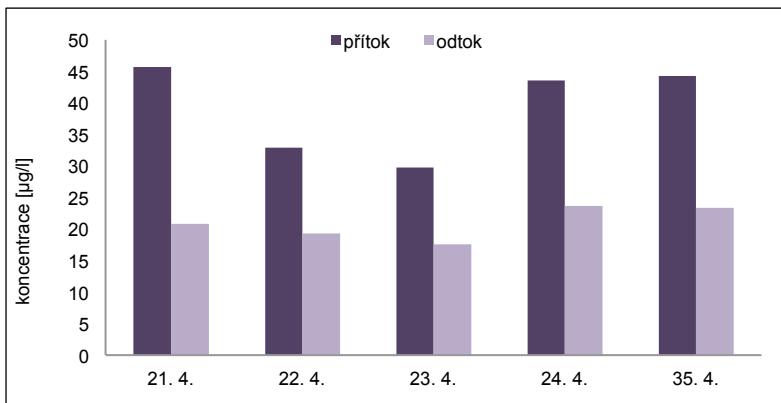
Tabulka 3: Naměřené koncentrace β -blokátorů v reálných vzorcích povrchové vody

den	místo odběru	koncentrace [$\mu\text{g/l}$]		
		atenolol	metoprolol	propranolol
21. 4.	Váh 1	< LOD	11,30	3,275
	Váh 2	< LOD	7,172	3,661
27. 4.	Dyje 1	< LOD	4,913	0,9303
	Dyje 2	< LOD	5,418	0,7084

Stanovené koncentrace β -blokátorů prokázané v odpadních vodách z ČOV Brno-Modřice na přítoku i na odtoku jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4: Naměřené koncentrace β -blokátorů v reálných vzorcích odpadní vody

den	přítok / odtok	koncentrace [$\mu\text{g/l}$]		
		atenolol	metoprolol	propranolol
21. 4.	přítok	< LOQ	45,71	3,197
	odtok	< LOD	20,86	2,654
22. 4.	přítok	2,201	32,92	4,292
	odtok	< LOQ	19,25	3,460
23. 4.	přítok	1,976	29,76	0,6348
	odtok	< LOD	17,62	1,062
24. 4.	přítok	< LOQ	43,61	2,078
	odtok	< LOD	23,64	2,051
25. 4.	přítok	1,493	44,32	0,6180
	odtok	< LOD	23,34	< LOQ



Obr. 2: Koncentrace metoprololu na přítoku a odtoku ČOV

4 Závěr

V této bakalářské práci byla řešena aktuální problematika stanovení léčiv v povrchové a odpadní vodě. Toto téma je v posledních letech velmi aktuální, především vzhledem ke stoupající spotřebě léčiv a jejich následujícímu negativnímu dopadu na ekosystém. Z léčiv byla vybrána skupinu β -blokátorů, konkrétně atenolol, metoprolol a propanolol.

Vzorky povrchové vody byly odebrány ze dvou vodních toků, a to Váhu na Slovensku a Dyje v České republice. Vzorky odpadní vody byly odebrány v ČOV Brno-Modřice, a to jak na přítoku, tak i na odtoku.

Pro stanovení β -blokátorů byla jako vhodná analytická metoda vybrána metoda ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) s UV-VIS detekcí pomocí diodového pole (DAD), což je rychlá, cenově dostupná a dostatečně citlivá analytická metoda, vhodná pro jejich stanovení. Pro izolaci a zakoncentrování sledovaných analytů z vodní matrice byla použita extrakce tuhou fází (SPE).

Ve vzorcích odpadních vod byly prokázány koncentrace propanololu a atenololu v jednotkách $\mu\text{g/l}$, zatímco metoprolol byly kvantifikován až v desítkách $\mu\text{g/l}$. V povrchových vodách byly zjištěny koncentrace sledovaných analytů nižší, metoprolol a propanolol byly kvantifikovány na úrovni jednotek $\mu\text{g/l}$, přičemž koncentrace atenololu byla v případě povrchových vod vždy pod limitem detekce.

V závěru bylo provedeno posouzení účinnosti ČOV Brno-Modřice při odstraňování β -blokátorů z odpadních vod. Bylo zjištěno, že pouze malá část těchto látek je čistírnou odpadních vod odstraněna (asi 46 % metoprololu a 12,5 % propanololu), a proto mohou tato léčiva pronikat do povrchových vod. Pravděpodobně to rovněž mohlo přispět k vyšším koncentracím metoprololu a propanololu v povrchových vodách.

5 Literatura

1. CLEUVERS, M. Initial risk assessment for three β -blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere* [online]. 2005, vol. 59, s. 199–205 [cit. 2014-03-16]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2004.11.090.
2. HALLING-SØRENSEN, B., S. N. NIELSEN, P.F. LANZKY, F. INGERSLEV, H.C. H. LÜTZHOFT a S. E. JØRGENSEN. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere* [online]. 1998, vol. 36, s. 357–393 [cit. 2014-03-28]. DOI: 10.1016/S0045-6535(97)00354-8.
3. LINCOVÁ, Dagmar a Hassan FARGHALI. *Základní a aplikovaná farmakologie*. vyd. 2. Praha: Galén, 2007, 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0.
4. HYNIE, Sixtus. *Farmakologie v kostce*. vyd. 2. Praha: Triton, 2001, 520 s. ISBN 80-725-4181-1.
5. JØRGENSEN, S. E. a B. HALLING-SØRENSEN. Drugs in the environment. *Chemosphere* [online]. 2000, vol. 40, s. 691-699 [cit. 2014-04-03]. DOI: 10.1016/S0045-6535(99)00438-5.
6. SOMMER, Lumír. et al. *Základy analytické chemie II*. vyd. 1. V Brně: Vutium, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
7. GARAJ, Ján, Dušan BUSTIN a Zdeněk HLADKÝ. Analytická chémia: celoštátna vysokoškolská učebnica pre chemickotechnologické fakulty vysokých škôl. vyd. 1. Bratislava: Alfa, 1987, 740 s.
8. CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látiek*. vyd. 1. Praha: SNTL, 1990, 384 s. ISBN 80-030-0569-8.

Elektronické vlastnosti biosenzorů

*Martin Netočný
doc. Ing. Ota Salyk, CSc*

*Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická,
Ústav chemie materiálů
Purkyňova 464/118
612 00 Brno
Česká republika
martin.netocny@gmail.com*

Práce pojednává o organických tenkovrstvých tranzistorech a jejich možném využití jako chemických a biologických senzorů. Dále jsou rozvedeny elektrické vlastnosti a chování OEET zařízení v přechodném ději, ustáleném stavu a potenciální uplatnění OEET pro buněčné monitorování. V experimentální části je sledován vliv teploty, stárnutí, geometrie zařízení a kultivačních médií na funkci zařízení.

Klíčová slova: Organické polovodiče, PEDOT:PSS, OTFT, OEET, elektronový obvod, iontový obvod, ustálený stav, přechodný děj, sledování buněk.

Autor nedodal svůj příspěvek do uzávěrky sborníku.

Povrchová modifikácia hydroxyapatitu pre výrobu biodegradovateľných a bioaktívnych kompozitov z polyméru kyseliny mliečnej

Bc. Martina Orlovská

Ing. Ľuboš Bača, PhD.

Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie,
Ústav anorganickej chémie, technológie a materiálov
Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovenská republika
martina.orlovska54@gmail.com

1. Úvod

Kosti sú pevné a pružné orgány s mikroštruktúrou, ktorá je hierarchicky usporiadaná tak, aby poskytovala maximálnu pevnosť pri minimálnej hmotnosti¹. Je to konštrukčný kompozit zložený z kolagénových vláken s nanokryštálm hydroxyapatitu, vyzrážanými pozdĺž kolagénových fibríl².

Hydroxyapatit HAP so vzorcom $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, patrí do skupiny apatitických keramík. Je hlavnou anorganickou zložkou prirodzenej kosti (tvorí takmer 65 % hmot. kosti) a má rovnaké chemické zloženie ako kostný minerál. Vykazuje dobrú biokompatibilitu, osteokonduktivitu a prilnavosť ku kosti. Avšak čistý HAP je krehký, má nízku mechanickú pevnosť, praská, je ľahko tvarovateľný, a preto nemôže odolávať běžnému zaťaženiu kostí a klbov. To je dôvod, prečo sa v posledných rokoch začali využívať kompozitné materiály biokeramika/polymér^{1,3,5-8}.

Cieľom práce bolo pripraviť časticie čistého hydroxyapatitu s nanometrovou veľkosťou a zistiť vplyv vybraných surfaktantov na morfológiu a veľkosť častic vzniknutého produktu. Komerčne dostupný polyvinylalkohol (Mowiol®) v rôznych stupňoch hydrolízy, tributylester kyseliny 2-acetyl-1,2,3-propántrikarboxylovej (ACTB), termoplastický škrob (TPS) sa použili ako povrchovo aktívne látky pri hydrotermálnej syntéze hydroxyapatitu v etanolovom roztoku. Pripravené časticie hydroxyapatitu sa analyzovali pomocou rastrovacieho elektrónového mikroskopu (REM), Fourierovou transformačnou infračervenou spektroskopiou (FTIR) a Röntgenovou fázovou analýzou (RTG).

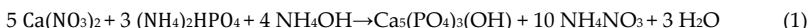
V literatúre je príprava hydroxyapatitových kryštálov hydrotermálou metódou veľmi dobre popísaná, avšak je len veľmi málo údajov o príprave samotných nanovláken HAP. Zhao a kol. pripravili tyčinky alebo vlákna HAP hydrolýzou biomolekúl sodnej soli riboflavínu-5'-fosforečného za hydrotermálnych podmienok s následnou reakciou

s vápenatými iónmi⁹. Zhang a kol. tiež pripravili nanovlákna HAP o dĺžke až 2 µm hydrotermálnej syntézou, avšak tento bol pripravený čiastočnou substitúciou Ca iónov s iónmi Si a Sr. Pomer iónov Si/Sr určoval výslednú morfológiu častíc¹⁰. Singh a kol. pripravili HAP kryštály o veľkosti ~45 nm a hrúbky ~12 nm hydrotermálnej syntézou pri 190°C v prítomnosti citrátu trisodného a hexadecyltrimethylammonium bromidu¹¹. Podobným spôsobom pripravili HAP tyčinky o veľkosti ~120 nm a hrúbke 25–50 nm aj Manafi a Rahimipour¹².

2. Experimentálna časť

2.1 Príprava čistého HAP

Hydroxyapatit bol pripravený hydrotermálou metódou v etanolovom roztoku podľa rovnice (1). Množstvá východiskových látok boli vypočítané tak, aby látkové množstvo Ca(NO₃)₂ zodpovedalo hodnote 0,02 mol. Pripravili sme si etanolový roztok Ca(NO₃)₂, ktorý sa postupne pridával do vodného roztoku (NH₄)₂HPO₄. pH tohto roztoku sme najprv upravili na hodnotu 10 pridaním vodného roztoku NH₃. Vzniknutú zrazeninu sme zriedili etanolom, aby celkové množstvo suspenzie dosiahlo 50 ml. Následne sme túto suspenziu spracovali hydrotermálne. Výsledný produkt sme 3x premýli destilovanou vodou a na záver etanolom, vysušili na jemný prášok a analyzovali príslušnými metódami. Hydrotermálne spracovanie prebiehalo v etanolovom roztoku pri teplote 200 °C po dobu 1 hodiny. V tabuľke 1 je zobrazený prehľad uskutočnených syntéz, analýz aj s príslušným označením vzoriek.



2.2 Príprava HAP so surfaktantom

Príprava hydroxyapatitu prebiehala rovnako ako bolo uvedené pre čistý hydroxyapatit, avšak surfaktanty boli pridávané v množstve 0,02 g, čo zodpovedalo 1 % teoretického množstva hydroxyapatitu. Medzi pridávané surfaktanty patrili Mowiol 8–88, Mowiol 10–98, Mowiol 18–88, Mowiol 20–98, termoplastický škrob (TPS) a acetyltributylcitrát (ACTB). Počas syntézy sme kontrolovali pH pripravovaných roztokov a aj vznikajúcej zrazeniny. Pripravenú bielu zrazeninu hydroxyapatitu sme uzavreli v autokláve a zahrieli pri teplote 200 °C po dobu 1 hodiny.

Tabuľka 1: Prehľad uskutočnených syntéz a príslušných analýz

	RTG	REM	HT	FTIR
HAP-E0	✓	✓	200 °C / 1 h	✓
HAP-E1 (Mowiol 8-88)			200 °C / 1 h	
HAP-E2 (Mowiol 10-98)	✓	✓	200 °C / 1 h	✓
HAP-E3 (Mowiol 20-98)			200°C / 1 h	
HAP-E4 (Mowiol 18-88)		✓	200°C / 1 h	✓
HAP-E5 (TPS)	✓	✓	200°C / 1 h	✓
HAP-E6 (ACTB)	✓	✓	200°C / 1 h	✓

2.3 Hydrotermálna syntéza

Hydrotermálna syntéza je proces, ktorý využíva reakcie v jednoduchej alebo heterogénej faze vo vodnom roztoku pri zvýšenej teplote $t > 25$ °C a tlaku $p > 100$ kPa. Samotná syntéza prebieha v uzavretej nádobe – autokláve¹³. Analyzovaná vzorka sa umiestní do nádoby z PTFE (polytetrafluóretylen), uzavrie sa a utesní v oceľovom plášti, a zahrieva sa na požadovanú teplotu. V uzavretom autokláve vzniká zahriatím obsahu autogénny tlak. V našej práci sme používali autokláv znázornený na obrázku 1.

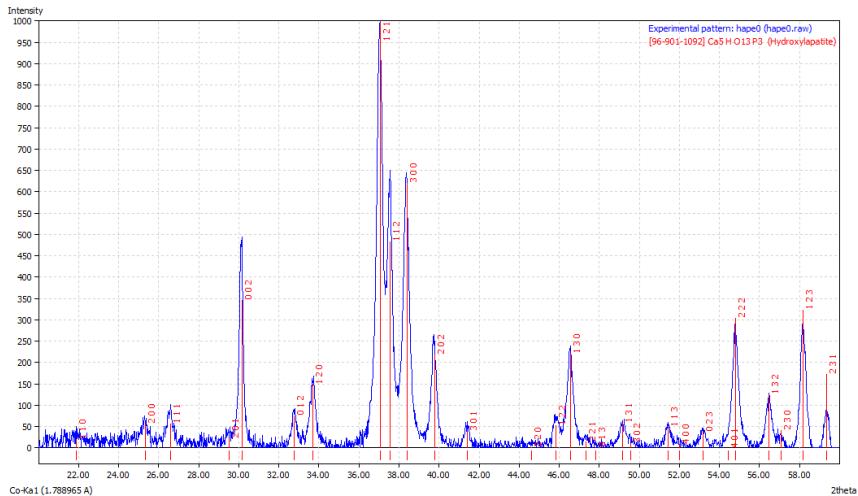


Obrázok 1: Laboratórny autokláv

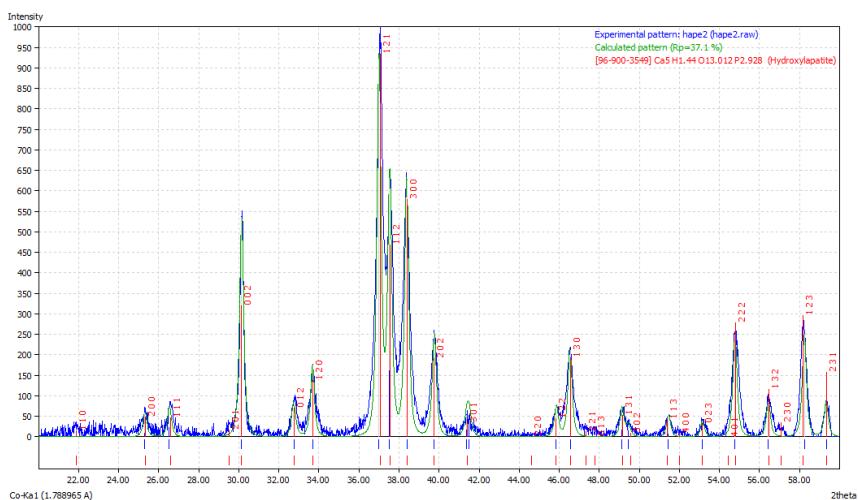
3. Výsledky práce

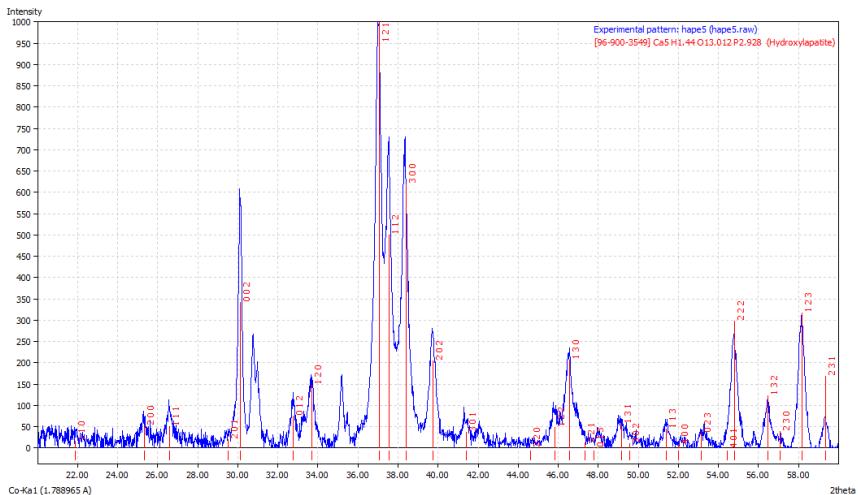
3.1 Záznamy RTG fázovej analýzy

Na obrázkoch č. 2–5 sú uvedené záznamy z RTG fázovej analýzy hydroxyapatitov HAP-E0, HAP-E2, HAP-E5, HAP-E6.

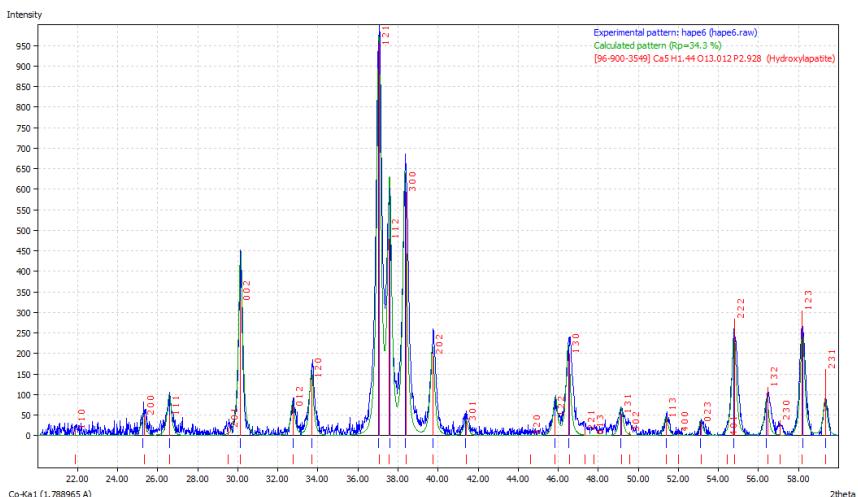


Z jednotlivých záznamov vyplýva, že z hľadiska fázového zloženia sa vo všetkých prípadoch pripravil takmer čistý hydroxyapatit s minimálnym množstvom nečistôt. Výnimkou je len RTG záznam HAP-E5, kde sa okrem častic hydroxyapatitu zosyntetizovali aj časticemonetitu Ca_2HPO_4 . Tieto časticemonetitu sú reprezentované neoznačenými písmenami v rozsahu uhlov 2θ 30-32 a 34-36 na obrázku 4.





Obrázok 4: RTG záznam hydroxyapatitu HAP-E5

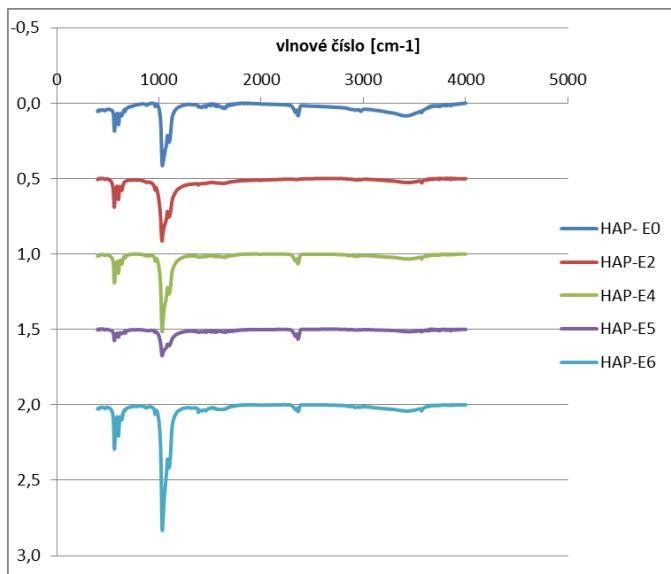


Obrázok 5: RTG záznam hydroxyapatitu HAP-E6

3.2 Záznamy FTIR analýzy

Na obrázku 6 máme znázornené FTIR spektrá niektorých vybraných práškov hydroxyapatitu. V spektre HAP môžeme pozorovať absorpcné pásy $\sim 563 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 604 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1032 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1055 \text{ cm}^{-1}$ a $\sim 2357 \text{ cm}^{-1}$ prislúchajúce PO_4^{3-} skupine. Absorpčné pásy nad

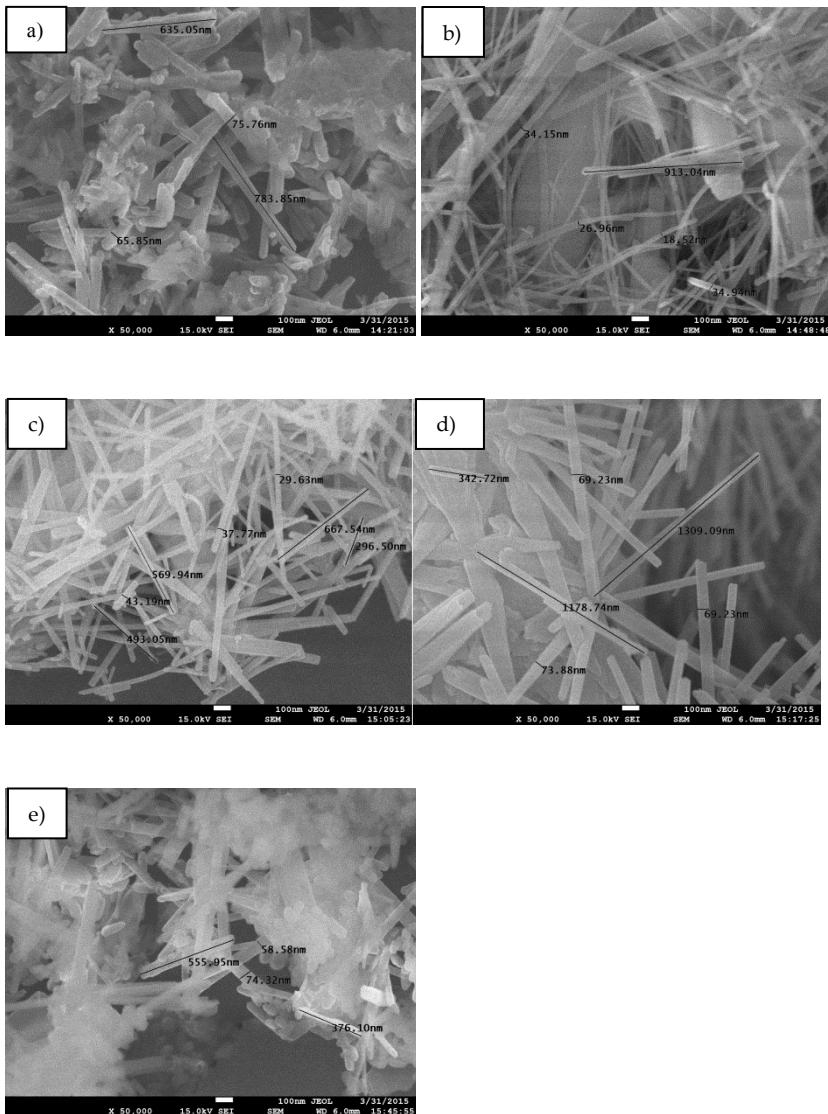
$\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ patria OH⁻ skupine^{14, 15}. Po vyhodnotení záznamov usudzujeme, že príďavok surfaktantov ani etanolový roztok nám nijako neovplyvnia zloženie hydroxyapatitu.



Obrázok 6: FTIR spektrá HAP

3.3 Záznamy REM analýzy

REM analýza nám umožňuje porovnať veľkosť a morfológiu nanočastic hydroxyapatitu bez a s príďavkom surfaktantov po hydrotermálnej syntéze. Výsledky tejto analýzy sú znázornené na obrázku č. 7, kde sú porovnané vzorky s príďavkom surfaktantu so vzorkou bez príďavku povrchovo aktívnej látky. Ako je možné vidieť, vzorka bez príďavku polyméru (obr. 7a) vykazuje bimodálnu morfológiu častic. Vo vzorke sa nachádzajú súčasne oválne časticie o veľkosti niekoľkých nanometrov, zároveň s tyčinkami HAP o veľkosti 300 až 600 nm a hrúbke 50–80 nm. Na druhej strane, vo vzorkách s príďavkom polyméru sme pozorovali zmenu v tvare a homogenite pripravených HAP kryštálov. Vzorka HAP-E2 s vyšším stupňom hydrolýzy (obr. 7b) obsahuje v prevažnej miere vlákna HAP s veľkosťou až ~ 1000 nm a hrúbkou ~ 20 –50 nm. V prípade vzorky s nižším stupňom hydrolýzy (HAP-E4) homogenita pripravených kryštálov stúpa (obr. 7c). Zároveň však samotné kryštály nie sú vlákna, ale pripomínajú skôr tyčinky o veľkosti 500–600 nm a hrúbky 20–50 nm, kde pomer dĺžka/priemer je cca 12. Na obr. 7d sme pozorovali najdlhšie nanotyčinky v porovnaní s ostatnými vzorkami. Kryštály HAP mali dĺžku až 1300 nm a hrúbku približne 70 nm, na rozdiel od vzorky HAP-E6 (obr. 7e) kde nám vznikli viditeľne kratšie tyčinky. Na obr. 7e si okrem iného môžeme všimnúť, že časticie HAP majú podobnú morfológiu ako vzorka HAP-E0.



Obrázok 7: Porovnanie morfológie častíc pripravených hydrotermálnym spracovaním pri $200\text{ }^{\circ}\text{C}/1\text{ h}$, a) HAP-E0, b) HAP-E2, c) HAP-E4 d) HAP-E5 e) HAP-E6

4. Záver

Hydrotermálnou syntézou sme za prítomnosti povrchovo aktívnych látok pripravili nanočasticie hydroxyapatitu s vláknitou a tyčinkovitou štruktúrou. Takto pripravené nanočasticie sa následne analyzovali RTG, FTIR a REM analýzou. Tieto analýzy nám potvrdili prítomnosť častíc hydroxyapatitu vo všetkých vzorkách. V prítomnosti surfaktantov nadobudli nanočasticie tvar vlákien s veľkosťou až do ~1000 nm a hrúbkou ~20–50 nm. Prídacok surfaktantov zabezpečil zvýšenie homogenity častíc. Takto pripravené nanočasticie HAP môžu byť vhodné pre ďalšiu prípravu biokompozitných materiálov so zvýšenou pevnosťou.

5. Literatúra

1. C. Y. Zhang, H. Lu, Z. Zhuang, X. P. Wang, Q. F. Fang, J Mater Sci: Mater Med (2010) 21:3077–3083.
2. S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, K. W. Leong, Composites Science and Technology 61 (2001), 1189–1224.
3. E. Ural, K. Kesenci, L. Fambri, C. Migliaresi, E. Piskin, Biomaterials 21 (2000) 2147–2154.
4. N. Tudorachi, A. P. Chiriac, J. Polym. Environ. (2011) 19:546–558.
5. J. Park, Bioceramics, 2008, ISBN 978-0-387-09545-5.
6. Ch. R. Kothapalli, M. T. Shaw, M. Wei, Acta Biomaterialia 1 (2005), 653–662.
7. M. Akram, R. Ahmed, I. Shakir, W. A. W. Ibrahim, R. Hussain, J Mater Sci (2014) 49:1461–1475.
8. J. Zhang, H.-M. Yin, B. S. Hsiao, G. – J. Zhong, Z. – M. Li, J. Mater. Sci. (2014) 49:1648–1658.
9. X.-Y. Zhao, Y.-J. Zhu, F. Chen, B.-Q. Lu, Ch. Qi, J. Zhaoa, J. Wu, Cryst Eng Comm, 2013,15, 7926–7935.
10. N. Zhang, D. Zhai, L. Chena, Z. Zou, K. Lin, J. Chang, Materials Science and Engineering C 37 (2014), 286–291.
11. R. K. Singh, T.-H. Kim, K. D. Patel, Ch. Mahapatra, K. Dashnyam, M. Sil Kang, H.-W. Kim, J. Am. Ceram. Soc., 97 [10] 3071–3076 (2014).
12. S. Manafi a M. R. Rahimipour, Chem. Eng. Technol. 2011, 34, No. 6, 972–976.
13. A. K. Nayak, International Journal of ChemTech Research, Vol. 2, No. 2, pp 903–907, 2010, ISSN: 0974-4290.
14. H. Zhang, Y. Yan, Y. Wang, S. Li, Materials Research, Vol. 6, No. 1, 111–115, 2002
15. E. Salimi, J. Javadpour, M. Anbia, International Scholarly Research Network 2012, ID 960915.

Príprava a charakterizácia mikro- a nanočastic s obsahom vybraných liečiv

Simona Sosková

Vedúca práce: prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

Konzultantka: Ing. Petra Matoušková

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie

Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Česká republika

xcsoskova@fch.vutbr.cz

1 Úvod

Striktné vzatá nanomedicina je zatiaľ hľadou budúcnosti, predstavuje priamu aplikáciu techník molekulárnej nanotechnológie v medicíne. Nanomedicínu je možné aplikovať v celej rade odborov, ako napríklad nanodiagnostika, nanofarmakológia, regeneratívna medicína, implantáty, terapeutickí nanoboti¹. Nantechnológiu je možné s pomerne veľkým úspechom využiť aj vo výskume konvenčných liekov, pomocou nanočastic sa dá dobre sledovať napríklad distribúcia liekov v organizme. Pre klinické aplikácie nantechnológií je však omnoho zaujímavejšie priame použitie nanotechnológií pri návrhu liekov. Nanoštruktúry môžu predstavovať priamo vlastnú liečivú látku alebo sa môžu podieľať na distribúcii klasického farmaka v organizme pacienta².

Lipozómy sú fosfolipidové časticie, ktoré majú veľkosť od 20 nm do 5 µm. Ich základom je fosfolipidová membránna obalujúca priestor s vodou fázou. V lipozómoch môžu byť transportované hydrofilné aj hydrofóbne látky. Lipozómy je možné použiť napríklad k systémovej aplikácii liekov cestou kože alebo sliznice³.

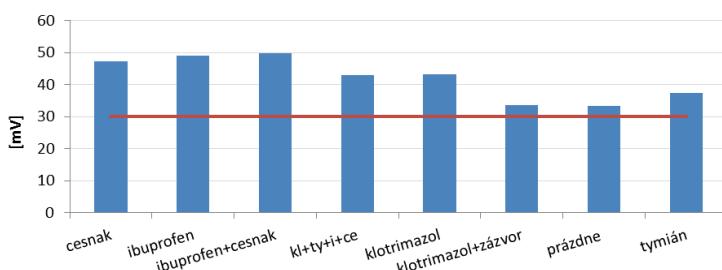
Táto práca je zameraná na prípravu, určenie veľkosti, stability, enkapsulačnej účinnosti a antimykotického pôsobenia mikro- a nanočastic s obsahom prírodných extraktov a liečiv. Pre prípravu prírodných extraktov boli vybrané nasledujúce bylinky: tymian obecný, ľubovník bodkovaný, majorán záhradný, skorocel kopijovitý. Ďalšie extrakty boli pripravené zo zázvoru lekárskeho a cesnaku kuchynského. Do častic boli enkapsulované takisto liečivá, a to ibuprofen ako protizápalová a analgetická zložka a klotrimazol ako antifungálna zložka.

2 Experimentálna časť

V praktickej časti boli u jednotlivých extraktoch stanovené obsahy polyfenolov, flavonoidov a antioxidačná účinnosť. Takisto bola optimalizovaná metóda HPLC pre stanovenie ibuprofenu a klotrimazolu. Ďalej boli pripravené lipozómy, alginátové a chitosanové časticie, do ktorých boli enkapsulované bylinné, zázvorové a cesnakové extrakty, ibuprofen, klotrimazol a niektoré kombinácie týchto zložiek. Celkovo bolo pripravených 32 typov častic. U pripravených častic bola sledovaná ich koloidná stabilita pomocou zeta potenciálu a ich veľkosť meraním pomocou DLS.

2.1 Veľkosť a stabilita častic

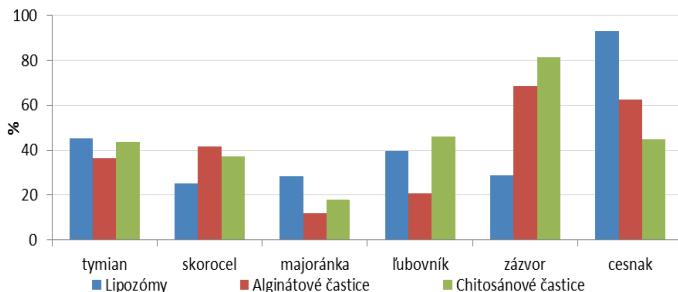
Veľkosť častic sa pohybovala od 33 do 1718 nm. Lipozómy sú v porovnaní s ostatnými časticami najmenšie. Najväčšie priemerné rozmerы dosiahli lipozómy s enkapsulovaným cesnakovým extraktom, a to 358 nm. Najmenšiu priemernú veľkosť z premeraných častic dosiahli lipozómy označované ako kombinácia, obsahujúce enkapsulovaný cesnak, klotrimazol, ibuprofen a tymian, a to 156,3 nm. Čo sa týka koloidnej stability, všetky typy pripravených lipozómov je možné považovať za stabilné. Z polysacharidových častic boli stabilné len alginátové časticie obsahujúce enkapsulovaný cesnakový extrakt.



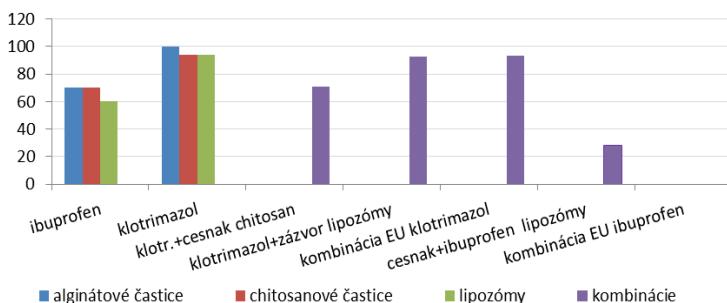
Obrázok 1: Koloidná stabilita lipozómov- hodnoty zeta pontenciálu sú uvádzané v absolútnej hodnote, červená čiara určuje hranicu zeta potenciálu 30 mV, ktorá je považovaná za hranicu stability

2.2 Enkapsulačná účinnosť

Podstatnú časť práce zaujíma štúdium a vzájomné porovnanie enkapsulačnej účinnosti extraktov a liečív uzavretých do jednotlivých typov častic. Najvyššiu hodnotu enkapsulačnej účinnosti dosiahol roztok klotrimazolu do alginátových častic, a to 99,93 %.



Obrázok 2: Enkapsulačná účinnosť extraktov



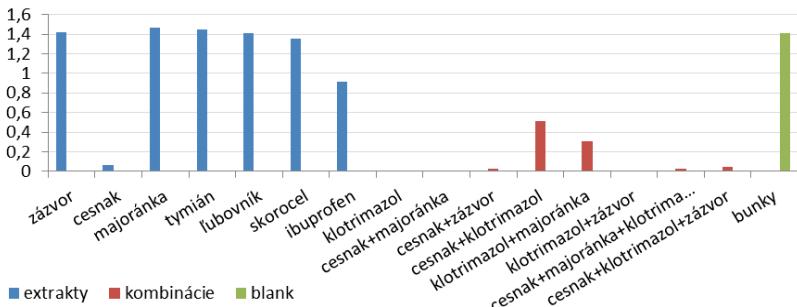
Obrázok 3: Enkapsulačná účinnosť liečív

2.3 Antimikrobiálne testy

Po príprave a charakterizácii extraktov a častic boli prevedené antimikrobiálne testy na kvasinkovom kmeni *Candida glabrata*. Bolo skúmané antifungálne pôsobenie extraktov, častic, rozrušených lipozómov, či roztokov klotrimazolu o rôznych koncentráciach.

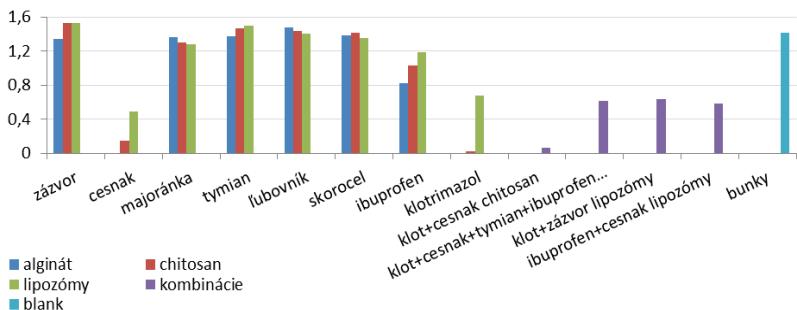
Skúmavkový antimikrobiálny test potvrdil, že po narušení membrány lipozómov olejom dôjde k uvoľneniu enkapsulovej zložky, a teda bol účinok rozrušených lipozómov na rozpad kvasiniek vyšší, ako v prípade neporušených lipozómov. To je predpokladom k postupnému uvoľnovaniu enkapsulovaných zložiek z lipozómov pri styku s pokožkou, ktorá obsahuje povrchové hydrofóbne zložky.

Predovšetkým extrakt cesnaku a roztok klotrimazolu prejavili vysokú schopnosť inhibície rastu kvasiniek. Pri diskovom antimikrobiálnom teste bola najväčšia inhibičná zóna vytvorená okolo jamky s chitosánovými časticami obsahujúcimi enkapsulovaný klotrimazol a cesnak.



Obrázok 4: Inhibícia rastu kvasiniek pôsobením extraktov a roztokov liečív

Antimikrobiálny test prevádzaný v mikrotitračnej doštičke pomocou ELISA readeru potvrdil antimykotický účinok klotrimazolu a extraktu cesnaku. Najlepšie inhibičné schopnosti preukázali opäť chitosanové častice obsahujúce klotrimazol a cesnak. Najvyšší účinok na rozpad kvasinkových buniek takisto spôsobil roztok klotrimazolu a extrakt cesnaku.



Obrázok 5: Inhibícia rastu kvasiniek pôsobením častíc s aktívnym obsahom

4 Závery

V tejto práci boli vytvorené lipozómy a polysacharidové častice pre možnú aplikáciu do kozmetických či farmaceutických produktov s antimykotickým účinkom. Ako najvhodnejšie častice pre tieto aplikácie boli stanovené lipozómy, predovšetkým lipozómy s klotrimazolom a cesnakom súčasne kombinované aj s ibuprofénom, ktorý pôsobí protizápalovo a analgeticky. U týchto častíc bol pozorovaný pozvoľný účinok v priebehu ich rozpadu pri styku s pokožkou, čo môže predísťif účinok výrobku. U alginátových a chitosanových častíc bola zaznamenaná u rovnakých kombinácií tiež vysoká antimikrobiálna aktivita. Avšak stabilita týchto častíc nedosahovala rovnakej kvality ako tomu bolo u lipozómov. Častice výrazne agregovali a tým znehodnocovali kvalitu výrobku.

Ako najvhodnejšie aplikáčne formy boli vybrané predovšetkým produkty na báze vody – rôzne gély. Ako najvhodnejší bol navrhnutý lipozómový hydrogéľ pripravený za pomoci stabilizátoru Carbomer s príavkom kombinovaných lipozómov o koncentráciach 20–30 %.

5 Literatúra

1. Nanowerk. In: *A nanotechnology formulation for glaucoma* [online]. 2014 [cit. 2015-04-27]. Dostupné z: <http://www.nanowerk.com/nanotechnology-news/newsid=33936.php>
2. RABIŠKOVÁ, Miroslava. Nanočasticie pro lékové formy. *Remedia* [online]. 2007, č. 5 [cit. 2015-04-27]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Okruly-temat/Technologie-leku/Nanocastice-pro-lekove-formy/8-1r-ix.magarticle.aspx>
3. HADAŠOVÁ, Eva. Lipozomální lékové formy. *Remedia* [online]. 2006, č. 16 [cit. 2015-04-27]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-formy/Lipozomalni-lekove-formy/6-H-gC.magarticle.aspx>.

Práca bola podporená z projektu L01211 MŠMT. Chcem tiež poďakovať vedúcej mojej práce, pani prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc. a konzultantke Ing. Petre Matouškovej za trpežlivosť, odborné rady a pomoc pri meraní.

Advanced fluorescent techniques for red yeasts characterization

Bc. Martin Vaněk

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.,

Ing. Filip Mravec, PhD., Ing. Andrea Hároníková, PhD.

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Physical and Applied Chemistry

Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech republic

xcvanekm@fch.vutbr.cz

1 Introduction

Carotenoids are of the most abundant natural colorants. These tetraterpenoids are unsaturated aliphatic and alicyclic hydrocarbons and oxidation products of these. They absorb light in blue and green region, having yellow to red colour. They are also good antioxidants¹. Thus they are used as colorants and dietary supplements², but they also have potential to be used as molecular wires in quantum computers^{3,4} and in biodegradable photovoltaics^{5,6,7,8}.

Red yeasts are microbes capable of carotenoid synthesis as their secondary metabolites. In red yeasts typically β-carotene, torulene a torularhodin are produced in response to oxidative stress⁹ and strong light exposure¹⁰. For industrial production the waste utilization is possible (e.g. spent coffee grounds¹¹, glycerol^{12,13}, lignocellulose wastes¹⁴). In biotechnology optimization, the quality of on-line analysis is desirable for the minimization of time and cost. Flow cytometry is one of such techniques.

In this study of four yeast species was autofluorescence-carotenoids correlation reviewed. Furthermore, the abilities of flow cytometry for quick and accurate biomass determination was examined.

Besides flow cytometry the laser scanning confocal microscopy (LSCM) was used for autofluorescence study and for carotenoids localization inside cells by means of autofluorescence and fluorescent probes. The insight into cells, which LSCM provides, is believed to help with understanding of carotenoid production. Thus, it has potential to make biotechnological production more cost-effective.

2 Experimental

2.1 Yeast cultivation

Yeast strains *Rhodotorula glutinis* (CCY 20-2-33), *Sporobolomyces roseus* (CCY 19-6-4), *Sporobolomyces shibatanus* (CYY 19-20-3) and *Cystofilobasidium capitatum* (CYY 10-1-2) was

cultivated on glucose medium (glu 40 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/l, KH_2PO_4 5 g/l, MgSO_4 0.34 g/l and yeast autolysate 7 g/l) with two-step inoculum used (of the same composition as the production medium). Cultivation was conducted at conditions of constant shaking (90 RPM) and illumination at 25 °C. For 140 hours was yeasts cultivated and approximately each 24 hours samples were taken for biomass, carotenoids and autofluorescence intensity determination.

2.2 Turbidimetric determination of biomass

Biomass determination was performed turbidimetrically at 630 nm (spectrophotometer Helios δ, Unicam), after appropriate dilution of cell suspension. Calibration curves published earlier¹⁵ was used for evaluation.

2.3 HPLC carotenoids determination

For carotenoids determination 100 mL of each culture was sampled and centrifuged (5 000 RPM, Sigma Laborzentrifugen), washed with distilled water and centrifuged again and after pellet was resuspended in physiological solution, the samples were freezed. Before analysis the samples were slowly thawed in dark, then centrifuged at 5 000 RPM for 10 minutes, washed with distilled water and centrifuged once again. Pellet was washed of a cuvette into mortar with acetone. Then it was desintegrated, transferred into evaporating dish and 50 mL 10% KOH in ethanol was added for saponification. Saponification was conducted for 30 minutes at 90 °C. The residue was extracted with diethylether several times, coupled fractions were evaporated on vacuum evaporator. Dried extract was dissolved in ethanol for HPLC (Sigma-Aldrich) and filtered through 0.44 µm membrane filter. Before injecting the sample on a column the samples were shortly centrifuged.

HPLC analysis was performed isocratically with methanol (for HPLC, gradient grade, Sigma-Aldrich) at 1 mL/min on column Kinetex C18 (2.6 mm, 4.6 × 150 mm, Phenomenex) tempered at 45 °C. Detection used was photometric with PDA, detection wavelength was 450 nm. Chromatografic instrumental set from company ECOM spol. s.r.o. was used. For data analysis chromatografic software Xcalibur was used.

β -carotene determination was performed using calibration curve established before¹⁵. For determination of torulene, torularhodin a total carotenoids content was the β -carotene calibration curve used due to lack of appropriate standards. For torulene and torularhodin identification their known spectra was used. For quantitative determination was used dependence of peak area on a concentration of standard⁹. Total carotenoids content determination was established as a sum of peak area of all carotenoids (all peaks after torularhodin).

2.4 Flow cytometric analysis

At the same time like the samples for biomass and carotenoid detemination was collected, the samples of cell suspension was taken for flow cytometric analysis (Apogee A50, ApogeeFlow Systems). Yeast cells were identified in scattergram and subsequent analysis of autofluorescence was performed at all four channels

(FL1 – FL4). PMT's voltage of detectors collecting fluorescent light was set to 500 V, FSC was set to 300 V and SSC to 400 V. 488 nm laser was used as excitation source.

2.5 Confocal microscopy

When the chromatographic analysis was performed, the fractions of each carotenoid were collected and their excitation and emission spectra were recorded (spectrofluorometer Flourolog, Horriba). Thus the appropriate wavelength for excitation for cell measurement can be chosen. On these fractions was then performed fluorescent lifetime analysis (MicroTime 200, PicoQuant) and carotenoids lifetimes were used in subsequent measurements.

Samples of cell suspension collected in different times of cultivation were prepared for microscopy by pouring 2% agarose over sample on cover glass. Samples fixed in this manner were measured under lenses of laser scanning confocal microscope MicroTime 200 at excitation wavelength 467 nm and emission filter 520/35.

Samples for measurements using Nile red (NR) was prepared by adding 5 µL of NR (1 mg/mL in acetone) into 1 mL of cell suspension. Samples were incubated for 3 minutes in dark and then they were treated with 2% agarose (see above).

3 Results and Discussion

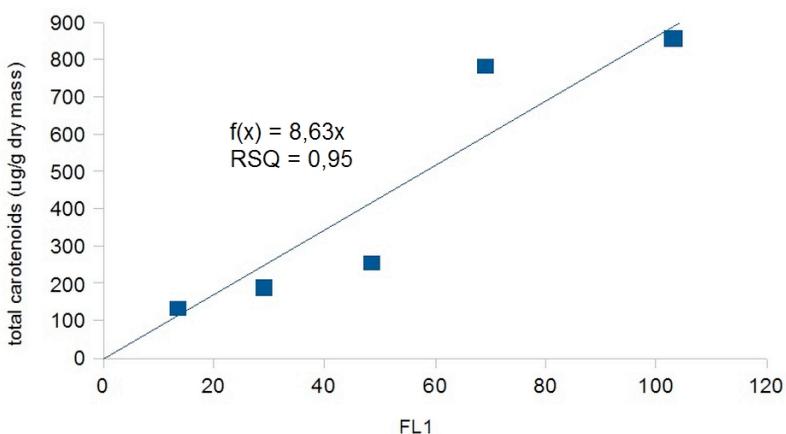
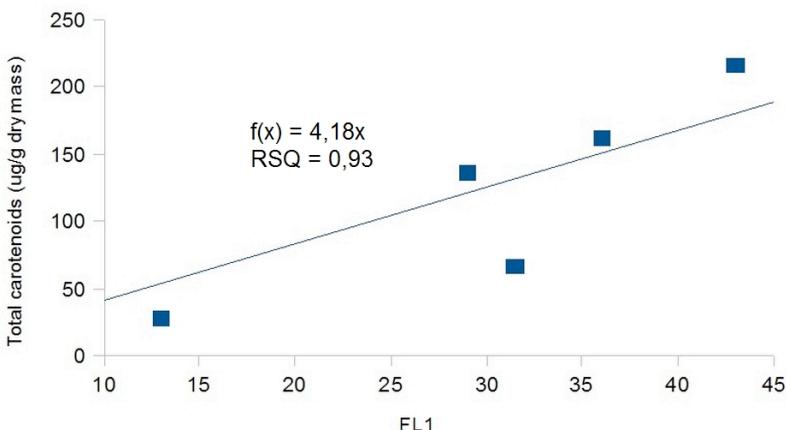
Using flow cytometer the values of MFSI/MSSI (mean forward/side scatter intensity) and MFI_x (mean fluorescence intensity, x is channel number) were established for each species at each time the samples were taken. MFI_x as the functions of time, $MFI_x = f(t)$, were compared with coupled carotenoids content in time. Correlations were found using least squares linear regression. All possible combinations between fluorescence channels and content of torulene, β -carotene and total carotenoid content were checked. Such high correlations were proved for *Rhodotorula glutinis* (Graph 1) and *Sporobolomyces roseus* (Graph 2) and their total carotenoid content using FL1 channel (green). For *Cystofilobasidium capitatum* and *Sporobolomyces shibatanus* such correlation were not found. Reasons are not known and will be subjects of further investigations. For the case of *Cystofilobasidium capitatum* there should be some kind of linkage with size of intracellular lipidic granules. Big granules were found using confocal microscopy (see further).

MFSI and MSSI values with number of cells n in 1 µL of cell suspension were used for biomass evaluation. Each sample were diluted in the same manner (50x), so there is no need to take dilution into account further. Simple model was established

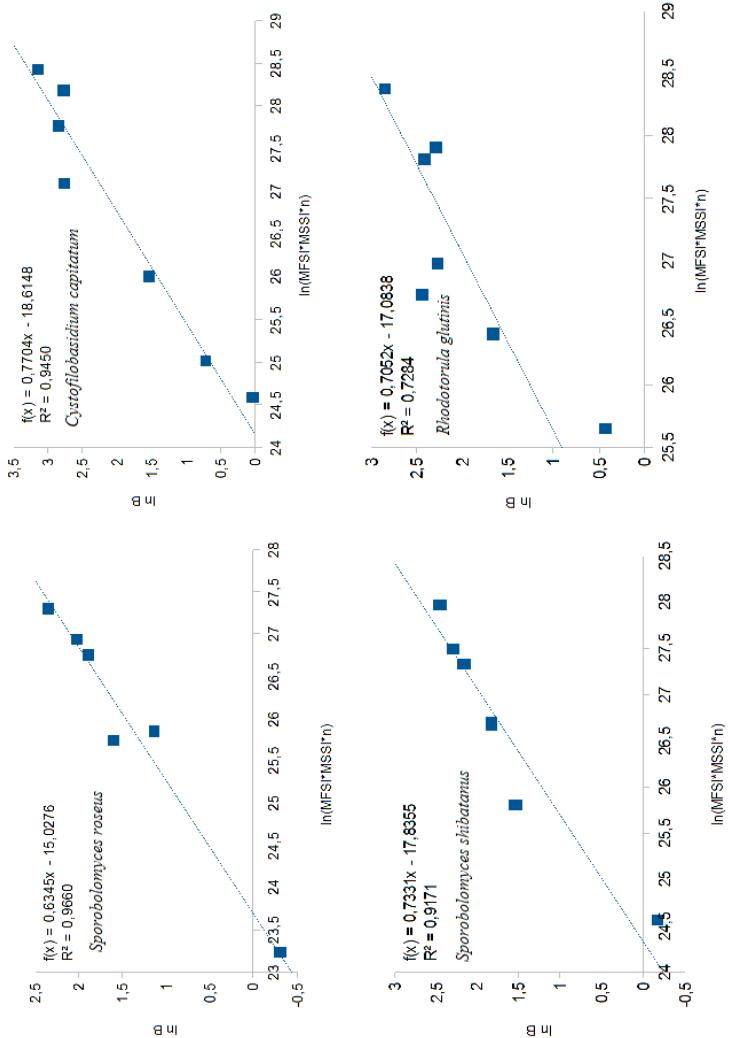
$$B = MFSI \cdot MSSI \cdot n \quad (1)$$

where forward scatter is proportional to cell diameter (and thus volume) and side scatter is proportional to inner complexity (and thus cell density). B means biomass quantity in g/L. For better clarity of graphs (Graph 3), both sides were logarithmed

$$\ln B = \ln (MFSI \cdot MSSI \cdot n) \quad (2)$$



With exception in *Rhodotorula glutinis* species, strong correlations were found. Thus it should be stated that flow cytometry is appropriate method for on-line biomass analysis in timescale of minutes after sampling from reactor.



Graph 3: Dependence between biomass, scatter and number of cells.

Time-resolved fluorescence measurements reveals extremely short carotenoids lifetimes (Table 1). This values were used for localization of carotenoids inside cells. Another useful values of intracellular fluorophores lifetimes were reviewed in literature: coenzymes lifetimes^{16,17} and lifetimes of various modifications of cytochrome c^{16,18,19}.

Table 1: Lifetimes of yeast carotenoids.

Compound	Lifetime (ps)
Torularhodin	3,2
Torularhodinalcohol	3,5
Torulene	2,8
β -carotene	5,5

Example of fluorescent lifetime imaging microscopy (FLIM) image of yeast autofluorescence is shown in Figure 1. Global image is in upper left corner. In upper right corner is shown 3.7 ns lifetime signal, which is due to Zn^{2+} cytochromes c in mitochondria.

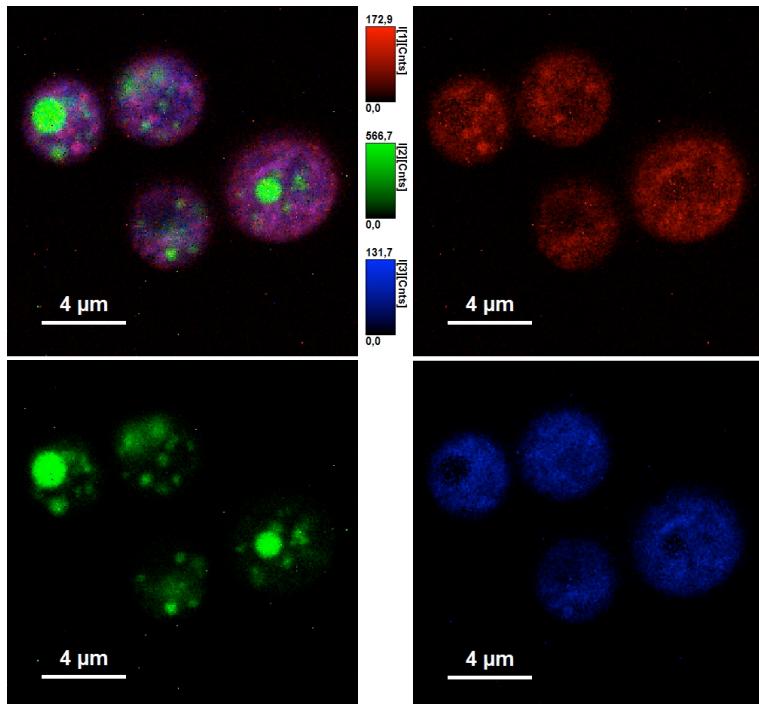


Figure 1: *Cystofilobasidium capitatum* FLIM images, after 35 hours of cultivation. Upper left global image, upper right 3,7 ns lifetime (cytochromes c in mitochondria), bottom left 4,4 ps lifetime (carotenoids) and bottom right 792 ps lifetime (FAD).

There should be seen oval to kidney-like bodies, which are mitochondria. In bottom left corner is shown 4.4 ps lifetime signal from carotenoids. Strong localization in globular bodies is evident. Taking account nonpolar character of carotenoids, these bodies should be lipidic granules. In bottom right corner is 792 ps lifetime signal from flavinadenindinucleotides (FAD). It is localized widespread inside the cell with exception

of that bodies with carotenoids. This also suggests that carotenoids are in lipidic granules, where enzymes and their cofactors (like FAD) are rare.

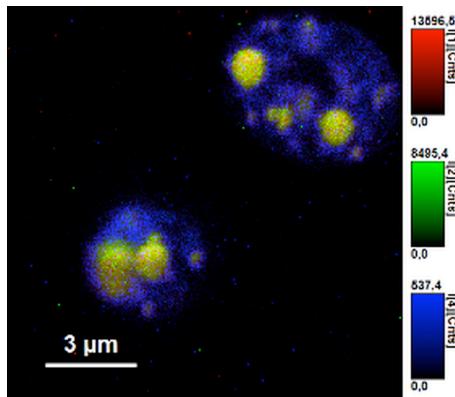


Figure 2: *Cystofilobasidium capitatum* stained with Nile red, global image. Image is displayed in RGB, thus only three of four lifetimes is shown. Red 3,87 ns (NR), green 1,62 ns (NR) and blue 537 ps (NADPH).

For approval of carotenoids inside the lipidic granules, cells were labeled with NR, which fluoresces in nonpolar conditions with double exponential decay of excited state – 1,6 and 3,8 ns lifetimes²⁰. In Figure 2 stained yeasts are shown. There are strongly prominent lipidic granules labeled with NR. They are so close in size and shape to that bodies observed when the autofluorescence was measured only. Furthermore, there is 75 ps lifetime inside granules, which should be denoted to carotenoid-NR interaction. Similar lifetime was observed in lag phase, pointing to carotenoid-ergosterol interaction (ergosterol is structurally similar to NR).

Approval of carotenoid-ergosterol interaction, eventually carotenoid-NR interaction, for excited state stabilization and lifetime extension will be subject of further investigation.

4 References

1. YOUNG, A. J., LOWE, G. M. Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001, **385**, 20–27.
2. NELIS, H. J. and De LEENHEER, A. P.. Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *Journal of Applied Bacteriology*. 1991, **70** (3), 181–191.
3. LI, J., TOMFOHR, J. K. and SANKEY, O. F. Theoretical study of carotene as a molecular wire. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*. 2003, **19** (1–2), 133–138.
4. VISOLY-FISHER, I., et al. Conductance of a biomolecular wire. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006, **103** (23), 8686-8690.
5. IRIMIA-VLADU, M., GLOWACKI, E. D., VOSS, G., BAUER, S. a SARICIFTCI, N. S. Green and biodegradable electronics. *Materials Today*. 2012; 15: 340–346.

6. IRIMIA-VLADU, M. *et al.* Environmentally sustainable organic field effect transistors. *Organic Electronics*. 2010, **11** (12), 1974–1990.
7. WANG, Xiao-Feng, *et al.* Natural Photosynthetic Carotenoids for Solution-Processed Organic Bulk-Heterojunction Solar Cells. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2013, **117** (2), 804–811.
8. PAN, J., BENKÖ, G., XU, Y., PASCHER, T., SUN, L., SUNDSTRÖM, V. and POLÍVKA, T. Photoinduced Electron Transfer between a Carotenoid and TiO₂ Nanoparticle. *Journal of the American Chemical Society*. 2002, **124** (46), 13949–13957.
9. MÁROVÁ I, ČARNECKÁ M, HALIENOVÁ A, KOČÍ R, BREIEROVÁ E. Production of carotenoid/ergosterol-supplemented biomass by red yeast Rhodotorula glutinis under external stress. *Food Technology and Biotechnology*. 2010, **48**, 56–61.
10. FRENGOVÁ G.I., BEŠKOVÁ D.M.: Carotenoids from Rhodotorula and Phaffia: Yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2009, **36**, 163–180.
11. PETRIK, S., OBRUČA, S., BENEŠOVÁ, P. and MÁROVÁ, I. Bioconversion of spent coffee grounds into carotenoids and other valuable metabolites by selected red yeast strains. *Biochemical Engineering Journal*. 2014, **90**, 307–315.
12. MAROVA, I., HARONIKOVA, A., PETRIK, S., KOSTOVOVA, I. and DVORAKOVA, T. Production of single cell oil and carotene-enriched biomass by red yeasts cultivated on waste glycerol. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011, **22**, S98.
13. PETRIK, S., MAROVA, I., HARONIKOVA, A., KOSTOVOVA, I. and BREIEROVA, E. Production of biomass, carotenoid and other lipid metabolites by several red yeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production – a comparative screening study. *Annals of Microbiology*. 2013, **63**(4), 1537–1551.
14. MAROVA, I., HARONIKOVA, A., PETRIK, S., OBRUCA, S., and KOSTOVOVA, I. Production of carotenoids, ergosterol and other lipidic compounds by red yeasts cultivated on lignocellulose waste substrates. *New Biotechnology*. 2014, **31**, S210–S211.
15. HÁRONIKOVA, A. Produkce vybraných kvasinkových metabolitů využitelných do potravinových doplňků. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 141 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Ivana Márová, Csc.
16. ISLAM, M., *et al.* PH Dependence of the Fluorescence Lifetime of FAD in Solution and in Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, **14** (1), 1952–1963.
17. SCHNECKENBURGER, H., KOENIG, K.. Fluorescence decay kinetics and imaging of NAD(P)H and flavins as metabolic indicators. *Optical Engineering*. 1992, **31** (7), 1447–1451.
18. VANDERKOOI, J. M., GLATZ, P., CASADEL, J. and WOODROW III, G. V. Cytochrome c Interaction with Yeast Cytochrome b2. *Eur. J. Biochem.* 1980, **110**, 189–196.
19. DIXIT, B. P. *et al.* Rotational Motion of Cytochrome c Derivatives Bound to Membranes Measured by Fluorescence and Phosphorescence Anisotropy. *Eur. J. Biochem.* 1982, **126**, 1–9.
20. KRISHNA, M. M. G. Excited-State Kinetics of the Hydrophobic Probe Nile Red in Membranes and Micelles. *The Journal of Physical Chemistry A*. 1999, **103** (19), 3589–3595.

Acknowledgement

This contribution is the result of the project implementation: "Materials Research Centre – Sustainability and Development" project Nr. LO1212 of the Ministry of Education, Youth and Sports g/l30

Stanovenie arzénu atómovou absorpčnou spektrometriou a prietokovou rozpúšťacou chronopotenciometriou

*Bc. Barbora Zelenayová,
Ing. František Čacho, PhD.*

*Slovenská technická univerzita v Bratislave ,
Fakulta chemickej a potravinárskej technológie,
Ústav analytickej chémie,
Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
barborazelenayova@gmail.com*

1 Úvod

Vo svete sa nachádza miliarda častíc, ktoré náš život bez vedomia ovplyvňujú pozitívne alebo negatívne. Arzén je na to typický príklad. Táto práca by mala širokej verejnosti objasniť arzén ako prvak a jeho význam v bežnom živote človeka. Najčastejším problémom ľudstva je ochrana životného prostredia. V posledných desaťročiach dochádza k sústavnému a opakovanejmu znečisťovaniu prostredia. Dochádza k zvyšovaniu koncentrácií toxickejch prvkov (As, Hg, Cd) a ich zlúčenín v pôde, vode, ovzduší čo môže zvyšovať ich obsah v potravinách a následnému vplyvu, nie len na zdravie človeka, ale aj zvierat a rastlín. Rimanky používali zlatozlty sulfid arzenitý As₂S₃ ako líčidlo a depilátor [1]. Traviči obľubovali oxid arzenitý (arzenik) As₂O₃, ktorý pridávali po malých dávkach do jedla, ale aj do sviečok, ktoré pri horení do ovzdušia rozptylovali toxicke pary [1]. Arzén je začlenený na základe účinkov na ľudský organizmus medzi toxicke prvky. Arzén a jeho zlúčeniny sa používali ako lieky i jedy od čias starovekého Grécka až do polovice 20. storočia [2]. Tieto arzénové prípravky sa prejavili ako nadmieru účinné prostriedky k usmrkovaniu mikroorganizmov a po mnohých rokoch sa k tomuto účelu aj využívali. Rozličnosť medzi dávkami pri tejto chemoterapii a dávkami toxickejmi nebol veľmi enormný, a tak mnogí chorí ľudia vykazovali príznaky otravy arzénom. Tu vzniká otázka je arzén liek alebo jed? Prvé historické zmienky o arzéne siahajú až do čias Hippokrata.

V 13. storočí nemecký alchymista Albertus Magnus ako prvý opísal metódu prípravy elementárneho arzénu. Názov pochádza od jeho zlatožltého nerastu auripigmentu As_2S_3 , ktorý za Aristotelových čias nazývali „arzenikom“ [2]. V mojej práci sa budem venovať prehľadu analytických metód použiteľných pre stanovenie arzénu atómovou absorpčnou spektrometriou (AAS) a rozpúšťacou chronopotenciometriou. Arzén je prvok 5. skupiny periodickej sústavy prvkov vyskytujúci sa väčšinou v ložiskách niektorých sulfidov kovov s relatívou atómovou hmotnosťou 74,9216 g mol⁻¹. Jeho koncentrácia v zemskej kôre sa odhaduje v priemere na 2 mg kg⁻¹. Vyskytuje sa vo forme anorganických a organických zlúčenín. V anorganických zlúčeninách sú prevládajúce oxidačné stupne +III a +V. V organických zlúčeninách ide predovšetkým o metylované formy. Minerály arzénu sú rozšírené po celom svete v zemskej kôre je rozšírenejší ako kadmium alebo zlato. V malých množstvách bol objavený aj vo voľnej forme. Ľudský organizmus v obyčajnej situácii obsahuje 10–20 mg arzénu. Ukladá sa v tkanivách, ako sú vlasy, srst, nechty, rohovina, ktoré sa využívajú pri identifikácii chronických otráv [3].

Zatial' čo o jeho zlúčeninách, či už organického alebo anorganického pôvodu sa to nedá vyjadriť. Zlúčeniny arzénu sú tým viac toxickejšie čím viac sú rozpustnejšie vo vode. S klesajúcim oxidačným číslom toxicita vzrástá, arzenit zlúčeniny As^{III} sú toxickejšie ako arzeničné zlúčeniny As^{V} a metylované formy arzénu sú menej toxické ako anorganické soli. Najtoxickejšie sú arzénne zlúčeniny As^{I} , napr. kyselina arzénna H_3AsO_2 a jej organické analógy R- H_2AsO_2 pôsobia toxicky okamžite [3]. Toxická dávka pre ľudský organizmus je 30–50 mg, akútnu otavu vyzvoláva 100 mg, ale 70 až 180 mg arzénu je pre človeka smrteľná dávka. Počas liečby otravy arzénom sa pravdaže presadzuje selén, ktorý tvorí nerozpustné selenidy (As_2Se_3). Arzén je kov sivej farby s kovovým leskom (sivý arzén). Zaraďujeme ho skôr medzi polokovy než medzi kovy kedže jeho chemické vlastnosti sú na hranici kovov a nekovov. Medzi zlúčeniny arzénu patria: Arzenitany, Arzeničnany, Arzénové farby [3]. V prírode sa As vyskytuje viac menej na každom kroku, či už v potravinách ale aj v pitnej vode, predovšetkým vo forme sulfidov a najčastejšie vo forme ako arzenopyrit FeAsS . Arén sa v podobe oxidu arzenitého uvoľňuje do prostredia pri spracovaní kovových rúd. Arzén nemá schopnosť vyplavovať sa zo zložiek životného prostredia avšak má tendenciu sa transformovať do inej formy z ovzdušia sa na zem dostáva usadzovaním alebo spadom dažďa [4]. Väčšina zlúčení arzénu je samozrejme

rozpustných vo vodnej zložke a hromadí sa v telách rýb a má nepriaznivý vplyv na vodný ekosystém. Do organizmu sa dostáva konzumáciou kontaminovanej pitnej vody, potravy, inhaláciou kontaminovaného vzduchu s obsahom pilín alebo popola zo spáleného dreva v pracovnom prostredí a v tele rastlín a živočíchov sa viaže s uhlíkom a vodíkom do formy organického arzénu [4]. V podobe prírodných zdrojov ako je vulkanická činnosť, zvetrávanie sa dostáva do životného prostredia ale aj priemyselnou činnosťou ako je spaľovanie fosílnych palív, ťažba nerastných surovín a uhlia. V prípade stanovenia arzénu môžeme použiť rôzne analytické metódy, z ktorých pomedzi najpoužívanejšími patria techniky: HGAAS, HGAFS, ICPMS .

2 Experimentálna časť

Cieľom práce bolo Stanovenie arzénu (V) atómovou absorpčnou spektrometriou po elektrochemickej separácii arzénu (III) zo vzorky.

2.1 Použité chemikálie

Pri analýzach sme používali deionizovanú vodu dodatočne prečistenú zariadením NANOpure firmy Wilkem Werner GmbH. Pre galvanostatickú rozpúšťiaciu chronopotenciometriu sa takto prečistená voda navyše zbavovala plynov prevarením a ochladením.

Referenčné materiály:

- Základný roztok As (III) (1,0000 g dm^{-3}) sme pripravili rozpustnením As_2O_3 (99,95–100 %, Sigma- aldrich, Bratislava SR) v 0,1 mol dm^{-3} NaOH.
- Základný roztok As (V) (1,0000 g dm^{-3}) sme pripravili rozpustnením As_2O_5 (\geq 99,99 %, Sigma- aldrich, Bratislava SR) v 0,1 mol dm^{-3} NaOH.

Chemikálie:

- HNO_3 p.a., konc., LACHEMA a.s., o.z. Neratovice, CZ
Obsah As max. 0,000003 % (kyselina bola dodatočne prečistená povrchovou redestiláciou).

- HCl p.a., konc., MikroCHEM spol. s.r.o., Pezinok, SR
Obsah As max. 0,00001 %.

Roztoky:

- ETAAS

Všetky roztoky používané pri ETAAS musia byť upravené príďavkom kyseliny dusičnej. A to takým množstvom, aby výsledná koncentrácia kyseliny dusičnej bola $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$.

- GST

Roztok základného elektrolytu: HCl $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$

Pozn. roztoky arzénu pre GST boli pripravované v základnom elektrolyte.

Modifikátor:

- Pd $c_m = 2,0 \text{ g dm}^{-3}$ Slovenský metrologický ústav.

2.2 Laboratórne prístroje a pomôcky

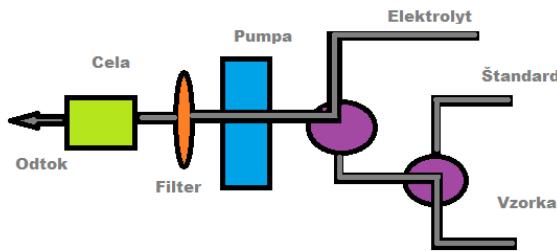
Prístroje:

- Pre atómovú absorpčnú spektrometriu

Pri tejto práci sme používali atómový absorpčný spektrofotometer AA-6300 s elektrotermickým atomizátorom GFA-EX7i firmy Shimadzu. Ako zdroj žiarenia bola použitá výbojka s dutou katódou.

- Pre rozpúšťaciu chronopotenciometriu

V tejto časti práce sme používali prístroj EcaFlow model 150 GLP firmy ISTRAN, s.r.o. Bratislava. Ďalej sme používali uhlíkovú pozlátenú poréznu elektródu s typovým označením E-53, ktorá sa vkladala do špeciálnej elektrochémickej prietokovej cely.



Obrázok 1: Bloková schéma prístroja Eca Flow model GLP 150

Pomôcky a laboratórne sklo:

Každé laboratórne sklo bolo pred každým použitím prečistené „nanopurovou“ vodou, kyselinou dusičnou a opäť vodou.

Používali sme tieto pomôcky:

- Odmerné banky 50 mL, 100 mL
- Kadičky: 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL
- Mikropipety firmy EPPENDORF
- Plastové flaše, plastové stričky, aparátura na redestiláciu kyseliny dusičnej

3 Pracovný postup

3.1 ETAAS

Pred začatím merania sme umiestnili do držiaka lámpr arzénovú lampa. Nastavili sme pracovné parametre a nechali sme ju minimálne 15–30 minút žhaviť. Následne sme spustili všetky potrebné súčasti meracieho zariadenia. Zapli sme korekciu pozadia metódou SMITH-HIEFTJE a spustili nosný plyn (argón). Nastavili sme teplotný program, vlnovú dĺžku, hodnotu vkladaného prúdu, šírku štrbiny, dávkovací objem roztokov.

Tabuľka 1: Pracovné parametre prístroja GFA-EX7i pre stanovenie arzénu

Kroky :	Sušenie		Pyrolýza			Atomizácia	Čistenie
Temperature (°C)	150	250	600	600	600	2200	2500
Time (s)	20	10	10	10	3	2	2
Head mode	ramp	ramp	ramp	step	step	step	step

Ramp....postupný ohrev

Step.... Skokový ohrev

Jednotlivé odporučané hodnoty teplotného programu sme neskôr optimalizovali.

Ďalšie parametre:

Vkladaný prúd12 mA

Vlnová dĺžka pre As.....193,7 nm

Šírka štrbiny.....0,7 nm

Dávkovací objem.....15 µl

3.2 GST

Pred analýzou sme zapli kontrolnú jednotku prietokového analyzátoru a počítač. V knižnici počítača sme vyhľadali merací program. Po jeho odštartovaní sme cez počítač nastavili požadované parametre. Naplnili sme nádobky pre základný elektrolyt, vzorku a ponorili sme do nich príslušné nasávacie hadičky. Naplnili sme prietokový systém a spustili meranie, ktoré už ďalej prebiehalo úplne automaticky. Procesy prebiehajúce v zariadení sa dajú zrhnúť takto: Prívodová hadička vzorky sa prepláchnie vzorkou. Najprv sa odmeria signál pozadia. Pri nastavenom prúde sa prekoncentruje zadaný objem základného elektrolytu. Po pretečení základného elektrolytu sa zastaví čerpadlo a potenciál sa presunie na štartovaciu hodnotu a zostane na tejto hodnote po dobu

ustálenia. Vylúčené kovy sa rozpustia nastaveným konštantným prúdom, pričom sa zaregistruje chronopotenciogram – signál pozadia. Po zapnutí čerpadla sa prípadne rozpustné kovy vyplavia roztokom elektrolytu z cely. To isté sa automaticky opakuje pre zadaný objem roztoku vzorky, a tým sa získa signál vzorky, od ktorého sa automaticky odčíta signál pozadia. [8]

Tabuľka 2: Pracovné parametre prístroja EcaFlow pre stanovenie As:

Prúd nahromadenia	[μ A]	-3100
Počiatočný potenciál	[mV]	-400
Koncový potenciál	[mV]	750
Rozpúšťací prúd	[μ A]	200
Doba ustálenia	[s]	10
Max. trvanie merania	[s]	30
Regeneračný potenciál	[mV]	900
Doba regenerácie	[s]	10
Objem vzorky	[ml]	1-5
Objem na premytie	[ml]	3
Objem na meranie pozadia	[ml]	1-5
Prietok min^{-1}	[ml]	3
Čerpadlo pri rozpúšťaní		Vypnuté

Odporučané hodnoty nahromaďovacieho prúdu a rozpúšťacieho prúdu sme prebrali zo starších diplomových a bakalárských prác.

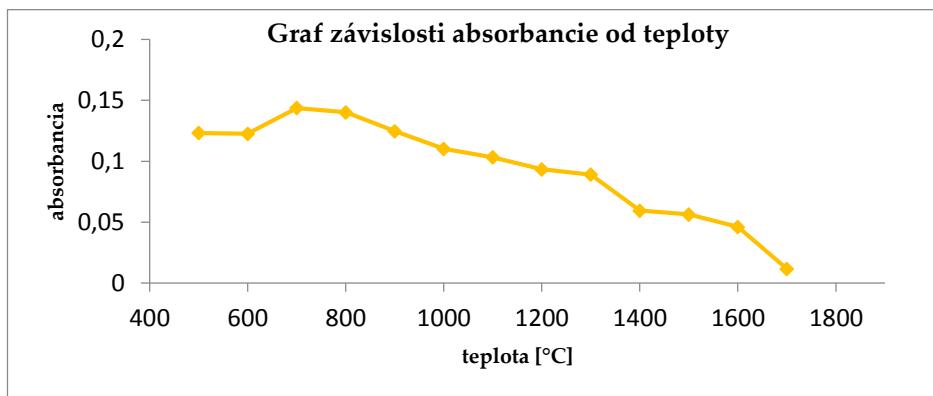
3.3 Výsledky a diskusia

3.3.1 ETAAS

Aby boli naše výsledky čo najpresnejšie, museli sme niektoré meracie parametre optimalizovať. Pri ETASS sme optimalizovali teplotu rozkladu (pyrolízy) a teplotu atomizácie pre arzén. Ďalej sme zisťovali lineárny rozsah kalibračnej krivky, opakovateľnosť merania a určili sme aj hodnoty medze detekcie a medze stanovenia.

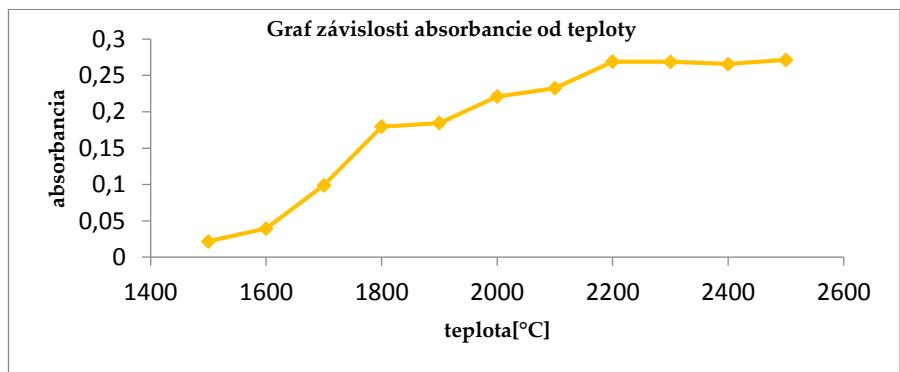
3.3.1.1 OPTIMALIZÁCIA PODMIENOK MERANIA PRE ETAAS

Rozkladnú a atomizačnú teplotu sme optimalizovali nasledovne: Pripravili sme si štandardný roztok arzénu o koncentrácií $c = 100 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$ z referenčného materiálu. Hodnotu atomizačnej teploty sme nastavili ako konštantnú a rozkladnú teplotu sme menili v určitých hraniciach. Potom sme vyniesli grafickú závislosť hodnôt absorbancie od rozkladnej teploty (obr. 2). Optimálna hodnota teploty sa nachádzala na zlome tejto závislosti. Potom sme rozkladnú teplotu nastavili konštantnú (už nami optimalizovanú) a menili sme teplotu atomizácie. Optimálna hodnota sa opäť prejavila na grafickej závislosti hodnôt absorbancie od atomizačnej teploty zlomom (obr. 3). Hodnotu rozkladnej teploty sme postupne menili od $500 \text{ } ^\circ\text{C}$ po $1700 \text{ } ^\circ\text{C}$. Z obr. 2 vidieť typický zlom, ktorý zodpovedá optimálnej rozkladnej teplote hodnote $700 \text{ } ^\circ\text{C}$.



Obrázok 2: Optimalizácia rozkladnej teploty pri doporučenej atomizačnej teplote $2200 \text{ } ^\circ\text{C}$

Optimalizáciu atomizačnej teploty sme robili rovnakým spôsobom. Hodnotu teploty rozkladu sme nastavili na 700 °C a teplotu atomizácie sme menili v rozsahu 1500 °C až 2500 °C. Z grafickej závislosti absorbancie od teploty atomizácie (obr. 3) sme podľa zlomu odčítali optimálnu teplotu atomizácie 2200 °C.



Obrázok 3: Optimalizácia atomizačnej teploty pri rozkladnej teplote 800 °C

Optimalizovaný teplotný program je zhrnutý v tab. 3. V ďalšej práci sme pracovali s uvedenými hodnotami.

Kroky :	Sušenie				Pyrolýza			Atomizácia	Čistenie
Temperature (°C)	90	90	150	250	700	700	700	2200	2700
Time (s)	15	10	20	10	15	10	3	2	3
Head mode	ramp	ramp	ramp	ramp	ramp	step	step	step	step

Tabuľka 3: Optimalizované pracovné parametre stanovenia As pre prístroj

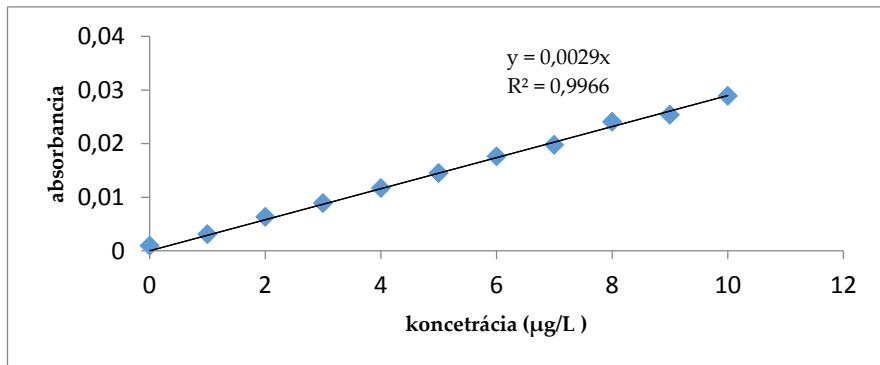
Ramp....postupný ohrev

Step.... Skokový ohrev

3.3.1.2 Validácia stanovenia

Analytická chémia je zaradená medzi prírodné vedy, ktoré sú charakterizované všeobecne platnými zákonosťami pri dodržaní podoných okrajových podmienok. Podmienka zachovania rovnakých okrajových podmienok však naráža na nemožnosť súčasne určiť všetky stavy reality, ktorá nás obklopuje. Tento difúzny obraz reality je kvantitatívne popísaný pravdepodobnosťou existencie určitého stavu. [10]. Z dôvodu tejto podmienky je nutné popri vlastnej analýze vykonávať aj pravdepodobnosťné zhodnotenie pozorovania, ktoré poskytuje informáciu o zvyškovej neistote merania. Na základe týchto téz sme sa rozhodli skúmanú metodiku štatistikému spracovaniu. Určili sme medzi detekcie, medzi stanovenia, opakovateľnosť a reprodukovateľnosť stanovení. Okrem toho sme samozrejme všetky namerané hodnoty otestovali na odľahlosť výsledkov.

Na určenie medze detekcie a medze stanovenia sme použili hodnoty získané zmeraním kalibračnej závislosti pre nízke koncentrácie, obr. 4.



Obrázok 4 : Kalibračná krivka pre nízke koncentrácie arzénu

3.3.1.3 Medza detekcie (LOD)

Medza detekcie (limit of detection, LOD) je podľa akceptovanej konvencie [10] štatisticky potvrdená hodnota signálu spôsobená najmenším množstvom analytu. Pre získanie koncentračnej hodnoty LOD sa používa tento vzťah:

$$C_D = \frac{3 \cdot \delta_b}{b_1} = \frac{3 \cdot 0,001868}{0,0029} = 1,9 \mu\text{g dm}^{-3}$$

δ_b ... smerodajná odchýlka slepého pokusu (0,001868)

b_1 ... smernica kalibračnej krivky (0,0029)

3.3.1.4 Medza stanovenia (LOQ)

Medza stanovenia (limit of quantification, LOQ) je podľa konvencie [9] štatisticky potvrdená hodnota množstva jednoznačne priraditeľná analytu. Pre získanie koncentračnej hodnoty LOQ sa používa vzťah:

$$C_D = \frac{10 \cdot \delta_b}{b_1} = \frac{10 \cdot 0,001868}{0,0029} = 6,4 \mu\text{g dm}^{-3}$$

δ_b ... smerodajná odchýlka slepého pokusu (0,001868)

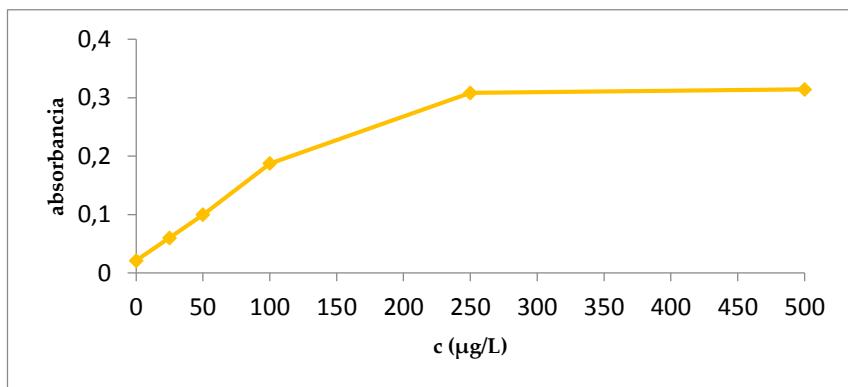
b_1 ... smernica kalibračnej krivky (0,0029)

3.3.1.5 Opakovateľnosť

Výsledky sú opakovateľné vtedy, keď ich s použitím tej istej vzorky dosahuje ten istý pracovník, tou istou metódou a na tom istom zariadení [10]. Opakovateľnosť sme určili meraním modelovej vzorky s koncentráciou $c = 10,00 \mu\text{g dm}^{-3}$, pričom merania sme vykonali na tom istom zariadení, za rovnakých podmienok, tým istým pracovníkom, v rýchлом časovom slede analýza). Opakovateľnosť bola $RSD = 3,3\%$ pre $n = 20$.

3.3.1.6 Kalibračná závislosť

Pracovný (lineárny) rozsah kalibračnej krivky je veľmi dôležitý. Pri meraní roztokov s koncentráciami nad lineárny rozsah by došli k výrazným skresleniam výsledkov. Pripravili sme si roztoky arzénu s koncentráciami 0, 25, 50, 100, 250 a 500 $\mu\text{g dm}^{-3}$ vo vode s prídomkom kyseliny dusičnej. Tieto sme potom premerali na atómovom absorpčnom spektrometri pri optimalizovanom teplotnom programe. Z nameraných hodnôt sme vyniesli grafickú závislosť absorbancie od koncentrácie od arzénu (obr. 5).



Obrázok 5: Určenie pracovnej časti kalibračnej krivky

Z obrázku 5 vidieť, že krivka je lineárna v rozsahu 0-100 $\mu\text{g dm}^{-3}$ As

3.3.2 Galvanostatická chronopotenciometria

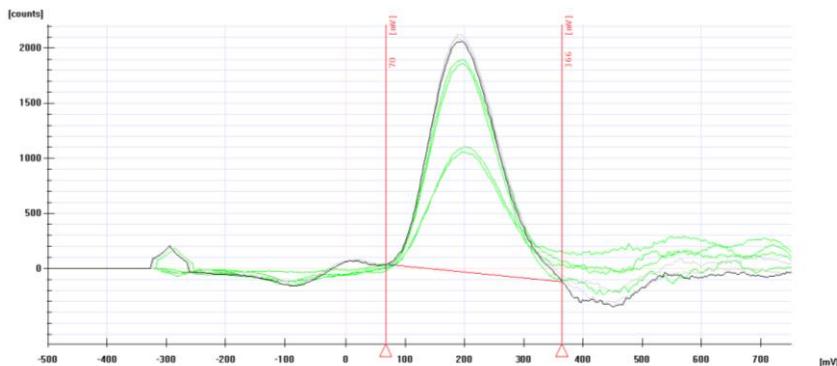
Optimalizácia pracovných podmienok pre galvanostatickú rozpúšťacieho chronopotenciometria pozostáva z optimalizácie nahromaďovacieho a rozpúšťacieho prúdu. Pri optimalizácii nahromaďovacieho prúdu sme použili roztok arzénu s koncentráciami $10 \mu\text{g dm}^{-3}$ a $20 \mu\text{g dm}^{-3}$ pripravený v základnom elektrolyte. Tento sme analyzovali na prietokovom elektrochemickom analyzátori. Nastavili sme odporúčané pracovné parametre a zvolili sme dávkovací objem na 3 mL. Pracovné podmienky sú zobrazené aj na pracovno mokne riadiaceho programu. (obr. 6)

Všeobecné | Preparácia | Regenerácia | Meranie | Kalibrácia | Výpočet | Vzorky |

Nahromadenie	Pauza (s)	Objem (ml)
Edepos : 0 mV	Quiesc1 : 10	Vzorka : 2
Idepos : -3100 uA	Quiesc2 : 10	Pozadie : 2
Regen : 5		Preplach : 3
Potenciál (mV)		
Estart1 : -500	Rozpúšťanie :	Segmentovať vzorku
Estart2 : -500	Istrip : 200 uA	<input checked="" type="radio"/> Nie <input type="radio"/> Áno
Estop : 750	Max. čas : 60 s	Merací mód
Eregen : 800	Pumpa : <input checked="" type="radio"/> Vyp <input type="radio"/> Zap.	<input checked="" type="radio"/> Mód A <input type="radio"/> Mód B
Estndby : 750	Prietok : 3 ml/min	

Obrázok 6: Pracovné parametre pre meranie arzénu

Na obr. 7 je vidieť záznam stanovenia arzénu. Zelené čiary zodpovedajú kalibračným roztokom, čierne čiary opakoványm meraniam analyzovanej vzorky.



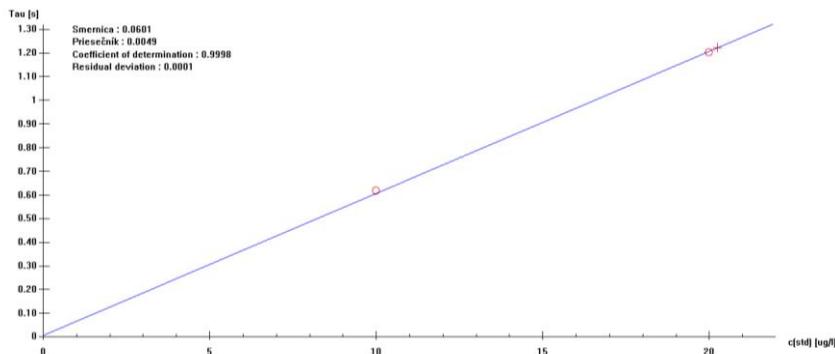
Obrázok 7: Záznam stanovenia arzénu

Na obr. 8 sú vidieť koncentrácie kalibračných roztokov.

As	ug/l
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>Kalibračná priamka</p> <p>Cstd1 : <input type="text" value="10"/> ug/l</p> <p>Cstd2 : <input type="text" value="20"/> ug/l</p> <p>Cstd3 : <input type="text" value="0"/> ug/l</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>Přípravy štandardu</p> <p>Cstd : <input type="text" value="20"/> ug/l</p> <p>1. prípravok : <input type="text" value="0"/> ml</p> <p>2. prípravok : <input type="text" value="0"/> ml</p> <p>3. prípravok : <input type="text" value="0"/> ml</p> </div> </div>	

Obrázok 8: Koncentrácie kalibračných roztokov

Grafická závislosť pre kalibráciu roztokov arzénu s koncentráciami $10 \mu\text{g dm}^{-3}$ a $20 \mu\text{g dm}^{-3}$ pripravené v základnom elektrolyte vynesená na obr. 9.



Obrázok 9: Grafická závislosť kalibrácie arzénu s koncentráciami $10 \mu\text{g dm}^{-3}$ a $20 \mu\text{g dm}^{-3}$

Pre hlavný experiment tejto práce sme použili roztok, ktorý obsahoval súčasne $20 \mu\text{g dm}^{-3}$ arzénu (V) a $20 \mu\text{g dm}^{-3}$ arzénu (III) v prítomnosti kyseliny chlorovodíkovej a v prevarenej vode. V prvom kroku sme spustili elektrochemické stanovenie arzénu na prístroji EcaFlow. V tomto kroku sa arzén (III) zachytil v objeme pracovnej elektródy.

Princípom bola redukcia As(III) z roztoku HCl, ktorý preteká cez poréznu uhlíkovú elektródu upravenú s Au a kontinuálna redukcia a nahromadenie As vo forme As(0) v objeme elektródy. Počas nahromadenia bol roztok vytekajúci z elektrochemickej cely zachytený v objeme asi 1 mL do pripravenej predlohy. V tomto roztoku sa po pridaní 5 µL konc. HNO₃ stanovila koncentrácia arzénu metódou ETAAS. Arzén (V) sme stanovili na atómovom absorpcnom spektrometri. Nastavili sme dávkovanie 15 µL roztoku a 10 µL modifikátora (Pd).

Tabuľka 4: Výsledky stanovenia arzénu pomocou GST

	As[µg dm ⁻³]
1	20,1
2	19,6
3	20,3
4	20,4
5	20,2
Priemerná hodnota	20,1±0,3

Tabuľka 5: Výsledky stanovenia arzénu pomocou ETAAS

Opakovanie	As [µg dm ⁻³]
1	20,7
2	20,4
3	20,9
4	20,6
5	20,9
Priemerná hodnota	20,7±0,2

4 Záver

Arzén ako chemický prvok umiestnený v 15.skupine periodickej sústave prvkov s protónovým číslom 33 má široké uplatnenie vo farmaceutickom priemysle a poľnohospodárskom priemysle, kde možno zaradiť aj výrobu prípravkov na ničenie škodcov a deratizačných prostriedkov. Arzén sa vyskytuje vo forme anorganických a organických zlúčenín. Arzén je pre ľudský organizmus toxický. Organický arzén nevykazuje také výrazné toxicke účinky ako anorganický arzén. Arzén bol klasifikovaný ako karcinogén na základe preukázaného účinku na vznik rakoviny kože. Výhodou arzénu je, že má uplatnenie vo vede, ale aj v medicíne či v priemysle. V minulosti bol jeho rozvoj ovplyvnený tým, že bol známy ako jed na zabíjanie. V dnešnej dobe je arzén vnímaný ako prvok s vysokou toxicitou a preto je nebezpečná koncentrácia v prírodných vodách celosvetovým problémom. Arzén sa vyskytuje v oxidačnom stupni (-III), (0), (+III) a (+V). V prírode sa najčastejšie nachádza vo forme As(III) a As(V). V práci sme optimalizovali podmienky merania pre stanovenie arzénu (V) atómovou absorpčnou spektrometriou a optimalizáciu podmienok merania pre stanovenie arzénu (III) rozpúšťacou chronopotenciometriou. V experimentálnej časti práce, môžeme vidieť pokusy optimalizácie stanovenia arzén. Pri atómovej absorpčnej spektrometrii sme optimalizovali teplotu rozkladu (pyrolýzy) a teplotu atomizácie pre arzén. Ďalej sme zisťovali lineárny rozsah kalibračnej krivky a zamerali sme sa na kalibračnú čiaru pri nízkych koncentráciach. Pomocou rozpúšťacej chronopotenciometrie sme stanovovali arzén (III), kde sme optimalizovali nahromaďovací a rozpúšťiaci prúd. Cieľom práce bolo stanovenie arzénu (III) a po následnej oxidácii na arzén (V).

5 Literatúra

1. http://pdf.truni.sk/eskripta/vczv1/Chemicke%20prvky%20v%20ludskom%20organizme/data/As_frame.html
2. <http://www.gjar-po.sk/~greif3c/skola/ch/arzen.pdf>
3. http://pdf.truni.sk/e-skripta/vczv1/Chemicke%20prvky%20v%20ludskom%20organizme/data/As_frame

4. http://www.sazp.sk/slovak/struktura/COH/pchb/projekt_2004_01/informacne_listy/17.pdf
8. Evans E. H. a kol.: Analytical atomic spectrometry, John Wiley and Sons, Chichester, England (1998)
9. Stanovenie stopových prvkov prietokovou coulometriou. Metodické pokyny pre prístroj Eca Flow
10. Ševčík J. G. K.: Metodologie měření v analytické chemii. Univerzita Karlova, Praha 1996

Ďakujem vedúcemu práce Ing. Františkovi Čachovi, PhD. za odbornú pomoc a vedenie pri vypracovaní tejto práce.

*Sekce studentů bakalářských a magisterských
studijních programů*

*Tématický okruh anorganická chemie,
materiálové vědy a inženýrství*

Skúmanie pravosti odtlačkov pečiatok v dokumentoch

*Bc. Igor Arvensis
doc. Ing. Milena Reháková, PhD.*

*Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie,
Ústav prírodných a syntetických polymérov, Oddelenie polygrafie a aplikovanej fotochémie
Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
igor.arvensis@gmail.com*

1 Úvod

Hlavnou charakteristikou dnešnej doby je globálna digitalizácia, ktorá je neodmysliteľnou súčasťou našich životov. Rozvoj počítačových technológií a ich sprístupnenie širokej verejnosti nám v globálne šetrí čas i finančné prostriedky. Napriek tomuto trendu nestrácajú svoje postavenie tradičné tlačené média, medzi ktoré patria aj dokumenty. Ide prevažne o rôzne typy písomností vo forme listov, obchodných zmlúv či úradných listín. Ich úlohou je sprostredkovať informácie v nich obsiahnuté jednému alebo skupine adresátov. Niektoré typy dokumentov majú osobitý charakter a ich originalita musí byť chránená. Neoddeliteľnou súčasťou takýchto typov dokumentov sú preto rozličné ochranné prvky.

Predkladaná práca sa venuje skúmaniu pravosti úradných dokumentov. Pravosť takýchto dokumentov je charakterizovaná viacerými znakmi, akými sú predovšetkým podpis a odtlačok pečiatky. Analýza sporných odtlačkov pečiatok je nosnou témovej tejto práce. Problematica skúmania odtlačkov pečiatok je v značkej činnosti založená hľavne na porovnávaní sporných otláčkov s adekvátnym komparačným materiálom, ktorý predstavujú kontrolné odtlačky pečiatok, v analýze označované ako pôvodné, t.j. originálne.

2 Experimentálna časť

2.1 Výroba pečiatok a odtlačkov 1. generácie

Podľa nami vopred pripraveneého grafického návrhu sme si nechali zhotoviť komerčné pečiatky 1. generácie komerčným výrobcom.

Pre samotný experiment bolo najdôležitejšie disponovať veľkým množstvom vyhotovených kontrolných odtlačkov pečiatok príslušnej generácie. Tie nám následne slúžili pri komparácii originálnej pečiatky (pečiatka 1. generácie) a falošnej pečiatky (pečiatka 2. generácie). Odtlačky pečiatok boli zhotovované podľa rozličných hľadísk,

akými môžu byť zhotovené aj v samotnej praxi. Jednotlivé kritéria zhotovovania odtlačkov sú uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1.: Premenné parametre použité pri vyhotovení jednotlivých odtlačkov pečiatok.

Papier	kancelársky	prieklepový
Podložka pod papier	mäkká (5 ks papiera A4)	tvrdá (pracovný stôl)
Sklon odtlačenia	kolmý	prevaľovací
Použitý prítlak	silný (dôrazný)	slabý (voľný)
Spôsob odtlačenia	1 namočenie a 1 odtlačenie	1 namočenie a viacnásobné odtlačenie

Pečiatky 2. generácie sme pre nás experiment zhotovovali na základe zoskenovania kvalitatívne najlepšieho odtlačku pečiatky 1. generácie. Získaný sken sme následne použili na výrobu falošnej pečiatky, a to dvomi spôsobmi. V prvom prípade sme vybrané odtlačky (okrúhlá i obdĺžniková pečiatka) zoskenovali do súboru na zariadení Epson Stylus PHOTO PX730WD pri rozlíšení 1200 dpi. Súbor skenu sme následne ako predlohu bez ďalších úprav zanesli do firmy, kde nám z neho komerčne vyrobili pečiatku 2. generácie. Dôležité bolo, aby pečiatka druhej generácie bola vyrobená s ponechaním defektov spôsobených odtlačením pečiatky na papier.

V druhom prípade sme súbor skenu upravili pomocou grafického programu Adobe Photoshop CC tak, aby predloha pre výrobu pečiatok 2. generácie obsahovala minimálny počet defektov, teda odstránili sme v čo najväčšej miere rozpité línie znakov pečiatky. Po dokončení všetkých grafických úprav sme predlohu pre okrúhlú i obdĺžnikovú pečiatku 2. generácie vytlačili ako negatívy na pauzovací papier. Následne sme pomocou takto vytlačených negatívou vyrobili v laboratórnych priestoroch pečiatky 2. generácie fotopolymerizáciou.

Odtlačky pečiatok 2. generácie – komerčne i laboratórne zhotovených – sme zhotovovali podľa nezmeneného postupu, aký bol použitý pri vyhotovovaní odtlačkov pečiatok 1. generácie, pričom boli opäťovne použité premenné uvedené v Tabuľke 1.

2.2 Mikroskopické meranie hrúbky línií znakov na odtlačkoch pečiatok

V Tabuľkách 2-13 sú zahrnuté hodnoty hrúbky línie vybraných znakov odtlačkov textovej i okrúhlej pečiatky pre ich 1. aj 2. generáciu. Pečiatky boli odtláčané na kancelársky a prieklepový papier. Znaky, ktorých hrúbku sme merali, sú vyznačené na Obrázku 1.

NEZNÁMA FIRMA s.r.o.
Vymyslená ulica 98
765 43 Mesto na Dunaji
IČO: 210XYZ, 0246813579



Obr. 1: Merané znaky obdĺžnikovej a okrúhlej pečiatky

Tab. 2: Hrúbka línii vybraných znakov textovej pečiatky – 1. generácia, kancelársky papier.

znak	N	Á	M
hrúbka [μm]	564 ± 16	554 ± 23	518 ± 31
znak	m	l	M
hrúbka [μm]	435 ± 60	433 ± 38	481 ± 30
znak	j	Y	1
hrúbka [μm]	384 ± 24	401 ± 61	478 ± 40

Tab. 3: Hrúbka línii vybraných znakov textovej pečiatky – 2. generácia, kancelársky papier.

znak	N	Á	M
hrúbka [μm]	701 ± 21	609 ± 36	566 ± 14
znak	m	l	M
hrúbka [μm]	574 ± 18	605 ± 22	555 ± 11
znak	j	Y	1
hrúbka [μm]	528 ± 13	634 ± 42	530 ± 36

Tab. 4: Celková hrúbka línii textovej pečiatky – 1. a 2. generácia, kancelársky papier.

	hrúbka [μm]
1. GENERÁCIA	470 ± 63
2. GENERÁCIA	589 ± 55

Tab. 5: Hrúbka línii vybraných znakov textovej pečiatky – 1. generácia, priklepový papier.

znak	N	Á	M
hrúbka [μm]	612 ± 56	639 ± 44	521 ± 14
znak	m	l	M
hrúbka [μm]	580 ± 21	632 ± 26	546 ± 17
znak	j	Y	1
hrúbka [μm]	466 ± 23	616 ± 35	569 ± 26

Tab. 6: Hrúbka línii vybraných znakov textovej pečiatky – 2. generácia, priklepový papier.

znak	N	Á	M
hrúbka [μm]	1148 ± 76	827 ± 49	823 ± 53
znak	m	l	M
hrúbka [μm]	760 ± 37	755 ± 22	–
znak	j	Y	1
hrúbka [μm]	–	895 ± 40	773 ± 37

Tab. 7: Celková hrúbka línii textovej pečiatky – 1. a 2. generácia, priklepový papier.

	hrúbka [μm]				
1. GENERÁCIA	576 ± 57				
znak	N	Á	M	m	I
hrúbka [μm]	439 ± 12	511 ± 21	456 ± 24	417 ± 16	492 ± 31

Tab. 8: Hrúbka línii vybraných znakov okrúhlej pečiatky – 1. generácia, kancelársky papier.

znak	N	Á	M	m	I
hrúbka [μm]	439 ± 12	511 ± 21	456 ± 24	417 ± 16	492 ± 31

Tab. 9: Hrúbka línii vybraných znakov okrúhlej pečiatky – 2. generácia, kancelársky papier.

znak	N	Á	M	m	I
hrúbka [μm]	573 ± 72	519 ± 39	655 ± 54	436 ± 16	659 ± 45

Tab. 10: Celková hrúbka línii okrúhlej pečiatky – 1. a 2. generácia, kancelársky papier.

	hrúbka [μm]				
1. GENERÁCIA	463 ± 38				
znak	N	Á	M	m	I
hrúbka [μm]	573 ± 72	519 ± 39	655 ± 54	436 ± 16	659 ± 45

Tab. 11: Hrúbka línii vybraných znakov okrúhlej pečiatky – 1. generácia, priklepový papier.

znak	N	Á	M	m	I
hrúbka [μm]	658 ± 41	640 ± 24	–	688 ± 33	703 ± 45

Tab. 12: Hrúbka línii vybraných znakov okrúhlej pečiatky – 2. generácia, priklepový papier.

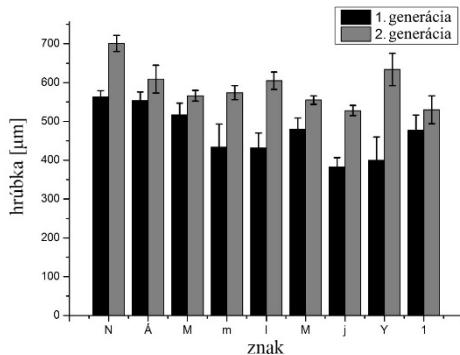
znak	N	Á	M	m	I
hrúbka [μm]	698 ± 30	799 ± 72	–	652 ± 33	–

Tab. 13: Celková hrúbka línii okrúhlej pečiatky – 1. a 2. generácia, priklepový papier.

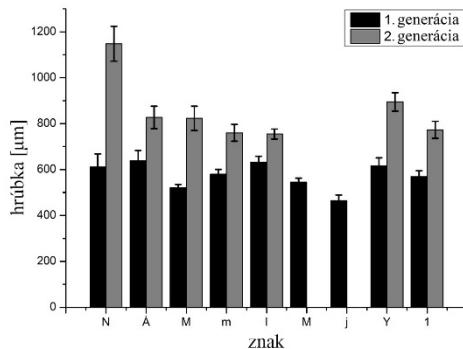
	hrúbka [μm]				
1. GENERÁCIA	672 ± 28				
znak	N	Á	M	m	I
hrúbka [μm]	698 ± 30	799 ± 72	–	652 ± 33	–

Mikroskopické skúmanie hrúbky línii vybraných znakov je komplexné vyhodnotené v Grafoch 1–4, v ktorých je zobrazená komparácia hrúbky línii znakov textovej a okrúhlej pečiatky ich 1. a 2. generácie na kancelárskom a priklepovom papieri.

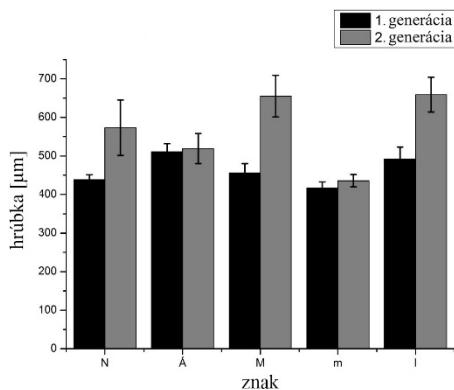
Graf 1: Porovnanie hrúbky línii znakov textovej pečiatky 1. a 2. generácie – kancelársky papier.



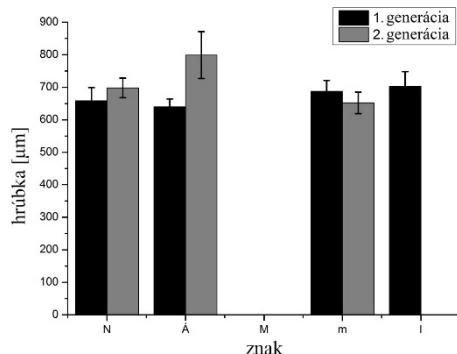
Graf 2: Porovnanie hrúbky línii znakov textovej pečiatky 1. a 2. generácie – príklepový papier.



Graf 3: Porovnanie hrúbky línii znakov okrúhlej pečiatky 1. a 2. generácie – kancelársky papier.



Graf 4: Porovnanie hrúbky línií znakov okrúhlej pečiatky 1. a 2. generácie – prielepový papier.



2.3 Komparácia odtlačkov pečiatok optickou metódou

Hlavnou metódou vyhodnocovania výsledkov práce je komparácia 1. a 2. generácie video-spektrálnym komparátorom VSC 5000. Porovnávali sme najmä zhodu hrúbok línií jednotlivých znakov, ich polohu v samotnom odtlačku (prekryv/presah línií). Prvotne sme vzájomne porovnali 1. a 1. generáciu odtlačkov, potom 1. a 2. generáciu otlačkov, ktoré boli vytvorené rôznymi premennými parametrami. Záznamy daného pozorovania sú uvedené v tabuľkách 14–19. Hodnotených bolo niekoľko veličín:

- hrúbka línií – konštatuje zhodu/nezhodu v hrúbke/prekryve jednotlivých línií,
- defekt – posudzuje prítomnosť/neprítomnosť defektov, t.j. chýbajúcich častí prítomných znakov v ich ploche alebo kontúre,
- grafický obraz – hodnotí tzv. medzipísmenové medzery (rozostupy jednotlivých písmen), komplexné zachovanie štruktúry odtlačku pečiatky a grafického vizuálu, vzhľadu,
- stupeň nezhody – vyjadruje celkové hodnotenie komparácie.

Vysvetlenie skratiek použitých v tabuľkách 14–19:

Pečiatka	1. generácia	1G	
	2. generácia vyrobená komerčne	2G	
	2. generácia vyrobená laboratórnym spôsobom	2G(B)	
Papier	kancelársky	k	
	prieklepový	p	
Podložka pod papier	mäkká	m	
	tvrdá	t	
Prítlak	silný	s	
	voľný	v	
	zhoda/prítomnosť	✓	
	nezhoda/neprítomnosť	✗	
CELKOVÉ HODNOTENIE (stupeň nezhody)			
0	1	2	3
žiadna nezhoda	1 parameter je nezhodný	2 parametre sú nezhodné	3 parametre sú nezhodné

Tab. 14: Porovnanie odťačku textovej pečiatky – 1. generácia s 1. generáciou.

Východiskový odťačok 1G k, m, s	hrúbka línií	defekty	grafický obraz	stupeň nezhody
porovnávané odťačky	1G k, m, v	✓	✗	0
	1G k, t, s	✓	✗	0
	1G k, t, v	✓	✗	0
	1G p, t, s	✗	✗	1
	1G p, t, v	✗	✗	1
	1G p, m, s	✓	✗	0
	1G p, m, v	✓	✗	0

Tab. 15: Porovnanie odťačku textovej pečiatky – 1. generácia s 2. generáciou.

Východiskový odťačok 1G k, t, s	hrúbka línií	defekty	grafický obraz	stupeň nezhody
porovnávané odťačky	2G k, t, v	✗	✗	2
	2G k, m, s	✗	✗	2
	2G k, m, v	✗	✗	2
	2G p, t, s	✗	✗	2
	2G p, t, v	–	–	–
	2G p, m, s	✗	✗	2
	2G p, m, v	–	–	–

Tab. 16: Porovnanie odťačku textovej pečiatky – 1. generácia s 2. generáciou (B).

Východiskový odťačok 1G k, t, s	hrúbka línií	defekty	grafický obraz	stupeň nezhody
porovnávané odťačky	2G(B) k, t, v	✗	✓	3
	2G(B) k, m, s	✓	✓	2
	2G(B) k, m, v	✓	✓	2
	2G(B) p, t, s	✗	✓	3
	2G(B) p, t, v	✗	✓	3
	2G(B) p, m, s	✗	✓	3
	2G(B) p, m, v	✓	✓	2

Tab. 17: Porovnanie odťačku okrúhlej pečiatky – 1. generácia s 1. generáciou.

Východiskový odťačok 1G k, m, v	hrúbka línií	defekty	grafický obraz	stupeň nezhody
porovnávané odťačky	1G k, m, s	✓	✗	0
	1G k, t, v	✓	✗	0
	1G k, t, s	✓	✗	0
	1G p, t, v	✓	✗	0
	1G p, t, s	✓	✗	0
	1G p, m, v	✓	✓	1
	1G p, m, s	✓	✗	0

Tab. 18: Porovnanie odťačku okrúhlej pečiatky – 1. generácia s 2. generáciou.

Východiskový odťačok 1G k, m, v	hrúbka línií	defekty	grafický obraz	stupeň nezhody
porovnávané odťačky	2G k, m, s	✗	✗	2
	2G k, t, v	✓	✓	2
	2G k, t, s	–	–	–
	2G p, m, v	✗	✗	2
	2G p, m, s	✗	✗	2
	2G p, t, v	–	–	–
	2G p, t, s	✗	✗	2

Tab. 19: Porovnanie odtlačku okrúhlej pečiatky – 1. generácia s 2. generáciou (B).

Východiskový odtlačok 1G k, m, v	hrúbka línií	defekty	grafický obraz	stupeň nezhody
porovnávané odtlačky	2G (B) k, m, s	✗	✓	✗
	2G (B) k, t, v	✗	✓	✗
	2G (B) k, t, s	✗	✓	✗
	2G (B) p, m, v	✗	✓	✗
	2G (B) p, m, s	✗	✓	✗
	2G (B) p, t, v	✗	✓	✗
	aj2G (B) p, t, s	✗	✓	✗

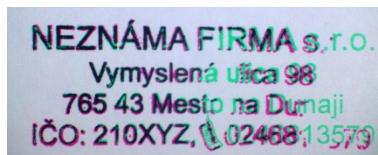
Okrem tabuľiek patria do tejto podkapitoly aj vizuálne zachytené vybrané komparácie odtlačkov textových pečiatok 1. generácie vzájomne (Obr. 2) a 1. a 2. generácie (Obr. 3–4), resp. okrúhlych pečiatok 1. generácie vzájomne (Obr. 5) a 1. a 2. generácie (Obr. 6–7). Z týchto grafických zobrazení je na prvý pohľad zrejmá zhoda/nezhoda v tvare, hrúbke, defektoch i v posunutí jednotlivých znakov, ktorá je kvalitatívne hodnotená v tab. 14–19.



Obr. 2: Komparácia odtlačku pečiatky 1G, k, m, s – 1G, k, t, s



Obr. 3: Komparácia odtlačku pečiatky 1G, k, m, s – 2G, k, m, s



Obr. 4: Komparácia odtlačku pečiatky 1G, k, m, s – 2G(B), k, m, s



Obr. 5: Komparácia odtlačku pečiatky 1G, k, m, v – 1G, p, m, v



Obr. 6: Komparácia odtlačku pečiatky 1G, k, m, s – 2G, k, t, v



Obr. 7: Komparácia odtlačku pečiatky 1G, k, m, s – 2G(B), k, m, s

4 Závery

V súlade so zadaním a stanovenými cieľmi práce sa preštudovala odborná literatúra týkajúca sa postupov a metód kriminalisticko-technického skúmania odtlačkov pečiatok na sporných dokumentoch. Komerčným spôsobom podľa navrhnutej textovej a grafickej predlohy sa dali zhотовiť dve drevené pečiatky – obdĺžniková a okrúhla. Z nich sa vyhotovili odtlačky pomocou čiernej pečiatkovej farby. Použili sa rôzne druhy papiera, rôzne tvrdé podložky, rôzne spôsoby odtlačania a rôzne sily prítlaku. Jeden z kvalitných odtlačkov sa použil ako grafická predloha pre výrobu napodobení originálnej pečiatky. Po zosnímaní predlohy táto bola jednak postúpená do ďalšej kommerčnej výrobne pečiatok a jednak bola pripravená polymérna matrica laboratórnym spôsobom. Z druhotne zhrozených pečiatok boli opäť zhrozené sady odtlačkov s rôznymi premennými parametrami výroby. Sledovala a hodnotila sa hrúbka línii vybratých znakov (mikroskopicky) a hľadali sa zhody a rozdiely v hrúbke, tvaru a štruktúre odtlačkov originálnej a falfizifikovanej pečiatky metódou optickej komparácie. Hlavné výsledky možno sumarizovať nasledovne:

- hrúbka čiar znakov na odtlačkoch originálnej pečiatky bola menšia približne o 28 %, ako hrúbka línii tých istých znakov na odtlačkoch falzifikátov. Zistenia platia pre odtlačky obdĺžnikových i okrúhlych pečiatok, na kancelárskom i prieklepovom papieri;
- na prieklepovom papieri boli hrúbky línii väčšie ako na papieri kancelárskom a to až o približne 45 %. Tento poznatok naznačuje, že je možné vzájomne porovnávať iba odtlačky vyhotovené na druhovo zhodnom papieri;
- výsledky komparácie, zohľadňujúce zhodu/nezhodu hrúbky, prítomnosť/neprítomnosť defektov odtlačkov a zhodu/nezhodu grafického usporiadania obrazu dokazujú, že odtlačky originálnych pečiatok sa jednoznačne dajú odlišiť od odtlačkov falzifikovaných pečiatok;
- odtlačky originálnych pečiatok, ktoré boli zhotovené použitím viacerých premenných faktorov, porovnávané vzájomne, môžeme považovať za zhodné;
- najvyššiu mieru nezhody vykazovali laboratórne vyrobené pečiatky, ktoré boli rozdielne vo všetkých sledovaných parametroch. Tieto závery platia pri odtlačkoch obdĺžnikových aj okrúhlych pečiatok.

5 Literatúra

1. Ellen, D. Scientific examination of documents: methods and techniques. CRC Press Taylor Grancis Group, 2006. ISBN 0-203-79183-5, 464 s.
2. Levinson, J. Questioned documents: A Lawyer's handbook, [online]. San Diego, California. Academic Press, 2001. ISBN 0-12-445490-9. Dostupné na internete: <http://books.google.sk/books?id=KQ5DioreWrwC&printsec=frontcover&hl=sk&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>.

Poďakovanie: Tento príspevok vznikol s podporou projektu VEGA č. 1/0888/15 a za spolupráce s Kriminalistickým a expertíznym ústavom Policajného zboru SR.

Teoretické štúdium modelových oligotiofénov terminovaných perfluórfenylhydrazínou skupinou

*Bc. Denisa Cagardová
prof. Ing. Vladimír Lukeš, DrSc.*

*Slovenská technická univerzita, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie,
Ústav fyzikálnej chémie a chemickej fyziky
Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
denisa.cagardova@gmail.com*

1 Úvod

Výskum nových organických materiálov použiteľných pri výrobe elektrických a elektronických súčiastok i optických prvkov zaznamenal v uplynulom období dvadsiatich rokov intenzívny rozvoj. Z pohľadu organickej syntézy sa navrhujú nové generácie molekúl, ktorých fyzikálnochemické vlastnosti sú modulované samotnou geometriou a štruktúrou molekuly, najmä alternáciou dĺžok konjugovaných väzieb a ich priestorovým usporiadaním. Chemická stabilita molekúl, ich rozpustnosť a zabudovateľnosť do polymérnej matrice rozhodujú, či nové molekuly budú predmetom záujmu aplikovaného výskumu. V súčasnosti majú organické materiály nezastupiteľnú úlohu pri výrobe širokej palety aktívnych elektrických prvkov, ako sú radary, laserové svetlá, svetlo-emitujúce diódy, detektory, modulátory, displeje, atď.

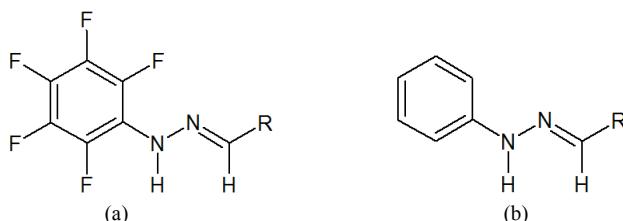
Na Fakulte chemickej a potravinárskej technológie prebieha združený výskum teoretických výpočtov, organickej syntézy a spektroskopických metód. Výskumná skupina z Oddelenia organickej chémie FCHPT STU navrhla v nedávnej dobe schému syntézy a spôsob separácie, ktoré môžu viesť k príprave nových heterocyklických derivátov metylén-2-perfluórfenylhydrazínu. V tejto súvislosti sa pripravila aj séria heterocyklických derivátov tiofénu s terminovaným metylén-2-perfluórfenylhydrazinom, ktorých základná fyzikálnochemická charakterizácia bola prezentovaná v bakalárskej práci „Syntetické využitie pentafluórfenylhydrazínu na prípravu nových heterocyklov vykazujúcich opto-elektronické vlastnosti a biologickú aktivitu“. Túto prácu napísal a obhájil v roku 2014 Bc. Dušan Bortnák na FCHPT STU v Bratislave. Na základe jednoduchých chemických úvah bol v spomínamej bakalárskej práci formulovaný predpoklad, že tieto nové deriváty metylén-2-perfluórfenylhydrazínu by mohli vytvárať vrstvy s elektrickou polovodivosťou typu n.

Predkladaná práca nadvázuje na závery Bc. Bortnáka¹. Hlavným cieľom diskutovanej problematiky je teoreticky podporiť alebo vyvrátiť predpoklad, či by deriváty metylén-2-perfluórfenylhydrazínu mohli byť potenciálne využiteľné pri

konštrukcií elektrických polovodičových vrstiev typu n. Ako metóda výskumu sa využijú metódy kvantovej chémie. Na výsledkoch výpočtov je možné posúdiť, ktorá kombinácia heteroaryl s metylén-2-perfluórfenylhydrazínom by vzhľadom na energie hraničných orbitálov, ionizačné energie a elektrónové afinity bola optimálna vzhľadom na daný typ elektrického polovodiča.

2 Experimentálna časť

Výskum, na ktorý je zameraná uvedená práca sa teoreticky sústreďuje na predpoklad praktického použitia rôznych heterocyklických derivátov terminovaných metylén-2-perfluórfenylhydrazínom (obr. 1) ako aktívnych elektrických polovodičových vrstiev typu n. Konkrétnie ide o štúdium 18 derivátov metylén-2-perfluórfenylhydrazínu, kde je 2-metylénhydrazínový mostík terminovaný päťčlánkovým alebo šesťčlánkovým aromatickým kruhom, ktorý môže obsahovať jeden alebo dva heteroatómy. Z uvedených substituentov sme vybrali pre ďalšie teoretické výpočty len heteroaromáty s jedným heteroatómom.



Obrázok 1: Štruktúrne vzorce študovaných fluórovaných a nefluórovaných derivátov metylén-2-fenylhydrazínu

Pomocou štandardných kvantovochemických výpočtov vybraných aromatických derivátov metylén-2-perfluórfenylhydrazínu sa budú diskutovať optimálne geometrie izolovaných molekúl a analyzujú sa hodnoty energií hraničných orbitálov HOMO (najvyššie obsadený) a LUMO (najnižšie neobsadený), elektrónové afinity a ionizačné potenciály. Aby bolo možné správnym spôsobom vyhodnotiť nájdené teoretické trendy, bude potrebné preskúmať aj nefluórované zlúčeniny metylén-2-fenylhydrazínu (obr. 1). Týmto chceme overiť predpoklad, či prítomnosť fluoru ako silného akceptora elektrónov na aromatickom jadre dokáže efektívne zabezpečiť výrazné zniženie energie LUMO. Kvôli referenčným účelom budú v práci prezentované teoretické výsledky výpočtov aj pre tertiofén (**Ths**) a molekulu fullerénu **C₆₀**. Oligoméry tiofénu sa v súčasnosti intenzívne využívajú ako elektrické polovodiče typu p. Na druhej strane, molekula fullerénu **C₆₀** predstavuje príklad na molekulu využívanú pri tvorbe organických polovodičových vrstiev typu n.

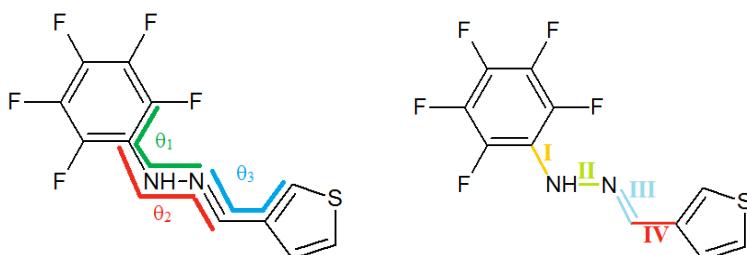
Získané teoretické údaje budú prezentované formou grafických závislostí a tabuľiek. Konečným cieľom tejto analýzy by mal byť aj návrh, ktoré chemické modifikácie derivátov metylén-2-perfluórfenylhydrazínu by mohli predurčiť organickú molekulu pre tvorbu polovodičovej vrstvy typu n.

Všetky kvantovochemické výpočty optimálnych geometrií a energetických veličín vybraných skupín molekúl v neutrálnom a elektricky nabitém stave boli uskutočnené

metódou elektrónovej hustoty (DFT). Pri DFT metóde sa využil funkcionál B3LYP². Ako báza atómových orbitálov boli použité Gaussove funkcie 6-311++G**³. Výpočty boli uskutočnené programovým balíkom Gaussian 09⁴. Výsledné geometrie molekúl, ako aj vybrané molekulové orbitály, boli zobrazované programom ArgusLab a Molekel.

2.1 Optimálne geometrie

Pri vyhodnocovaní optimálnych B3LYP geometrií študovaných modelových molekúl sme sa zamerali iba na vybrané dihedrálne uhly, ktoré jednoznačne charakterizujú priestorové usporiadanie metylén-2-fenylhydrazínového fragmentu. Tieto uhly a ich označenia sú uvedené na obrázku 2. V tabuľke 1 sú sumarizované hodnoty dihedrálnych uhlov pre deriváty s jedným heteroatómom vzhľadom na prítomnosť a neprítomnosť elektrónových akceptorných fluórov. Vzájomné porovnanie zistených údajov naznačuje, že nefluorované zlúčeniny v neutrálnom, ako i v elektricky nabitéch stavoch majú planárne geometrie. Na druhej strane, prítomnosť fluórov deformuje metylén-2-perfluórfenylhydrazínový fragment. Najmä uhol θ_1 , vykazuje hodnoty 13 až 30° pre elektricky neutrálne stavy. Najvyššie vykrievanie od roviny má fluórovaný derivát s tiofénovým substituentom. Všetky elektricky nabité stavy vykazujú planárne štruktúry.



Obrázok 2: Dihedrálne uhly a notácia vybraných väzieb študovaných molekúl

Tabuľka 1: Vybrané hodnoty B3LYP/6-311++G** dihedrálnych uhlov pre substitenty s jedným heteroatómom pre elektricky neutrálny stav (N)

		θ_1	θ_2	θ_3		θ_1	θ_2	θ_3
FuH	N	0	180	0	FuF	N	27	167
TioH	N	0	180	0	TioF	N	30	168
PyH	N	0	180	0	PyF	N	29	167
PdH	N	0	180	0	PdF	N	22	171

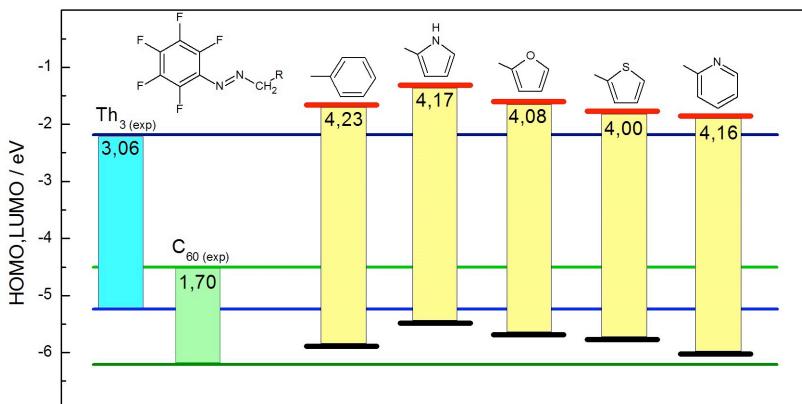
Prítomnosť rôznych aromatických fragmentov na konci 2-metylénhydrazínového mostíka má priamy dopad aj na samotné dĺžky väzieb. Aby bolo možné hovoriť o pravdepodobnej konjugácii elektrónov cez mostík, musí byť zabezpečená určitá alternácia dĺžok väzieb mostíka. Selektované dĺžky väzieb I až IV centrálneho mostíka z obrázku 2 sú uvedené v tabuľke 2. Kedže konjugáciu by malo zabezpečovať striedanie krátkych a dlhých väzieb, z tabuľky je zrejmé, že konjugácia v týchto molekulách nie je dostatočne zaistená. Možno teda usúdiť, že tento mostík nie je schopný zabezpečiť konjugáciu elektrónov medzi okrajovými chromofórmami. Má teda izolačný charakter.

Tabuľka 2: Hodnoty vybraných dĺžok väzieb

	I/Å	II/Å	III/Å	IV/Å		I/Å	II/Å	III/Å	IV/Å
FuH	1,391	1,339	1,284	1,438	FuF	1,385	1,357	1,281	1,438
PyH	1,387	1,347	1,286	1,437	PyF	1,384	1,367	1,283	1,436
TioH	1,391	1,339	1,284	1,440	TioF	1,386	1,359	1,281	1,440
PdH	1,392	1,335	1,283	1,460	PdF	1,384	1,351	1,279	1,463

2.2 Analýza hraničných orbitálov a elektrónová štruktúra

Ďalšia indícia, ktorá umožní posúdiť správnosť testovaného tvrdenia, môže vyplynúť z porovania energií hraničných molekulových orbitálov. Toto umožňuje kvalitatívnejšie posúdiť, či by samotná elektrónová štruktúra molekuly mohla podporiť elektrickú vodivosť typu p alebo n. Energie vybraných hraničných molekulových orbitálov HOMO a LUMO študovaných fluórovaných a nefluórovaných molekúl sú ilustrované na obrázku 3.



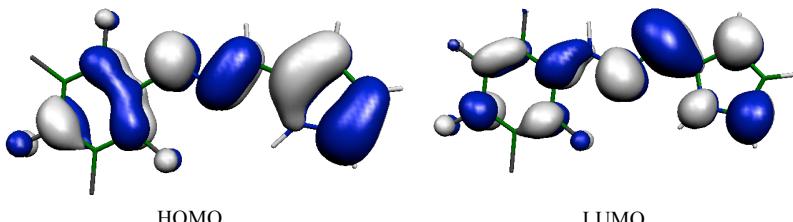
Obrázok 3: Hodnoty B3LYP/6-311++G** energií hraničných orbitálov HOMO a LUMO študovaných molekúl. Energetické rozdiely sú uvedené aj číselne v eV.

Kvôli porovnaniu sú v uvedených obrázkoch uvedené aj hodnoty pre modelový tiofénový oligomer tertiofén (Th₃) a molekulu C₆₀. Ako už bolo naznačené, prvý typ molekuly poskytuje elektrickú vodivosť typu p, zatiaľ čo druhá molekula je predstaviteľom organického polovodiča typu n. Vplyv štruktúry na hodnoty orbitálnych energií je evidentný.

Z pohľadu elektrickej vodivosti typu n, energia LUMO by mala nadobúdať hodnoty menšie ako -3,00 eV. V prípade molekuly C₆₀ sme získali teoretickú hodnotu -4,50 eV, čo je v súlade s doteraz publikovanými experimentálnymi a teoretickými údajmi⁵. Pre porovnanie možno uviesť, že teoretická hodnota energie orbitálu LUMO pre molekulu tertiofénu Th₃ je -2,18 eV.

Z uvedených údajov vyplýva, že hodnoty energetických medzier vybranej skupiny študovaných derivátorov metylén-2-perfluór-fenylhydrazínu sa príliš nepribližujú k hodnotám elektrického polovodiča typu n, ale viac k elektrickej vodivosti typu p.

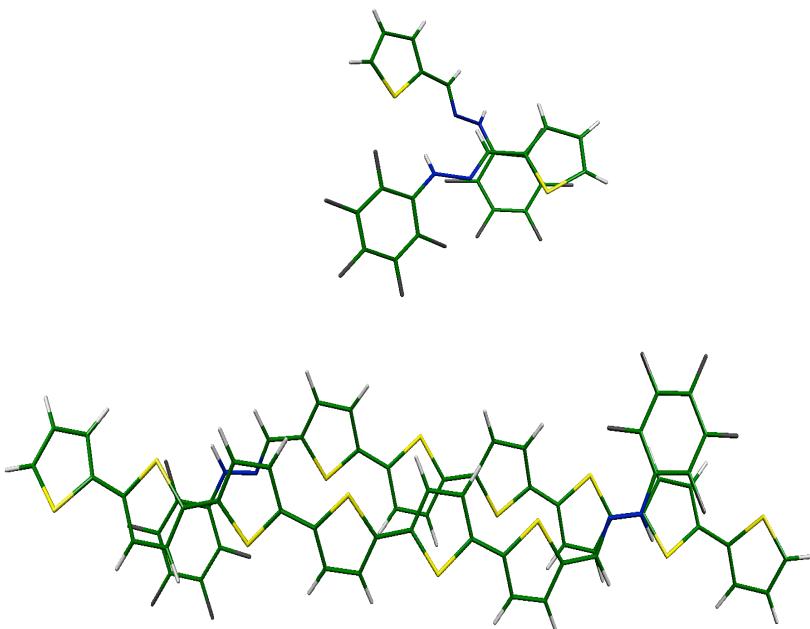
Na obrázku 4 sú ilustrované tvary orbitálov HOMO a LUMO študovanej zlúčeniny s terminovaným pyrodom na koncovej časti mostíka. Pre zabezpečenie konjugácie centrálneho 2-metylénhydrazínového mostíka musia byť laloky hraničných orbitálov navzájom rovnobežné a striedať znamienko. Z ilustrovaných schém hraničných orbitálov vyplýva, že v 2-metylénhydrazínovom mostíku je prerušená konjugácia, pretože laloky orbitálov súce striedajú znamienko, ale nie sú navzájom rovnobežné, teda nespĺňajú podmienky konjugácie. Zrejmý je aj vplyv fluórov substituovaných na fenylovej časti molekuly s pyrolovým fragmentom. Celkové tvary orbitálov HOMO a LUMO delokalizovaných nad fenylom a mostíkom sú viac-menej rovnaké. V prípade fluórovaných skeletov sa prejavuje mierna modifikácia tvaru nad fenylom. Atómy fluóra pôsobia elektrónovo akceptorne vzhľadom na uhlíkový skelet fenylu. Tvary zobrazených hraničných orbitálov sa výrazne menia nad druhým aromatickým kruhom.



Obrázok 4: Tvary B3LYP/6-311++G** hraničných orbitálov HOMO a LUMO pre molekulu s pyrolovým fragmentom a fluórovaným fenylovým jadrom

2.3 Modelové diméry

Vzhľadom k elektrickej polovodivosti typu p sme sa zamerali na tiofénový fragment termínovaný perfluórfenyl-2-metylénhydrazínou skupinou, pretože je najvhodnejším heteroaromatickým substituentom pre vznik uvedenej polovodivosti. Teoretický výpočet naznačil, že v tiofénových oligoméroch dochádza k prepojeniam jednotlivých molekúl a vzniku sendvičovej štruktúry v závislosti od počtu tiofénových jednotiek. Príklady uvedených π -dimérov sú ilustrované na obrázku 5.



Obr. 5: Sendvičovanie štruktúry oligomérov

3 Závery

V predloženej práci sme sa venovali teoretickému štúdiu modelových derivátov metylén-2-perfluórfenylhydrazínu a metylén-2-fenylhydrazínu. Štruktúra skúmaných molekúl sa menila vzhľadom na varírovanú koncovú skupinu na voľnej strane centrálneho 2-metylénhydrazínového mostíka. Koncové skupiny predstavovali päťčlánkové a šesťčlánkové aromatické molekuly s jedným heteroatómom. Niektoré z týchto molekúl boli nedávno pripravené a ich chemická charakterizácia bola prezentovaná v bakalárskej práci Dušana Bortňáka¹.

Uskutočnené kvantovochemické výpočty umožnili nájsť optimálne geometrie študovaných derivátov v elektricky neutrálnom stave, ako aj pre nabité aniónové a katiónové stavy molekúl. Porovnanie získaných údajov ukázalo, že vplyv chemickej modifikácie na jednotlivé geometrie nefluorovanéj triedy študovaných zlúčenín nie je významný. Adícia fluóru na fenylovej časti významne ovplyvňuje v určitej miere geometriu fenylhydrazínovej časti neutrálnych študovaných molekúl.

Dalším dôležitým zistením bola nedostatočná konjugácia centrálneho mostíka, ktorý spája fenylovú a substituovanú časť molekuly. Vzájomné striedanie dĺžok chemických väzieb mostíku nie je dodržané a ani chemická modifikácia substituentov túto skutočnosť

významne neovplyvní. Porovnaním energií hraničných orbitálov a štruktúry derivátov sme zistili, že študované zlúčeniny sa svojimi mikroskopickými vlastnosťami približujú viac k elektrickej vodivosti typu p.

Aj keď študované modelové molekuly by mohli tvoriť skôr polovodičové vrstvy typu p, zmena centrálneho mostíka molekuly by vedela výraznejšie modifikovať elektrickú vodivosť. Z tohto dôvodu by bolo vhodné uskutočniť systematické porovnanie teoretických výpočtov rôznych modifikácií centrálnej časti molekuly.

Ďalej sme teoreticky študovali aj tiofény a ich oligoméry, ktoré sa približovali k elektrickej polovodivosti typu p a teoretické výpočty naznačili sendvičovanie štruktúry v závislosti od počtu tiofénových jednotiek.

4 Literatúra

1. BORTŇÁK, D. Syntetické využitie pentafluórfenylhydrazínu na prípravu nových heterocyklov vykazujúcich opto-elektronické vlastnosti a biologickú aktivitu: bakalárská práca, Bratislava FCHPT. 20141
2. LEE, C. – YANG, W. – PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, Phys. Rev. 1988, vol. B37, s. 785–789
3. MCLEAN, A. D. – CHANDLER, G. S. Contracted Gaussian–basis sets for molecular calculations 1. 2nd row atoms, Z=11–18, J. Chem. Phys. 1980, vol. 72, s. 5639–5648
4. FRISCH, M. J. a i. Gaussian 03, Revision C.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT 2004...
5. CHIH-WEI Ch. a i., Tuning acceptor energy level for efficient charge collection in copper-phthalocyanine-based organic solar cells, Appl. Phys. Lett. 2006, vol. 88, 153504

Chcela by som podakovať prof. Ing. Vladimírovi Lukešovi, DrSc. za odborné vedenie, pomoc, konzultácie a cenné rady, ktorými prispel k práci.

Energetická analýza výrobne Fluidný katalytický krak

Bc. Maroš Filčák
Ing. Miroslav Variny, PhD.

Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Ústav chemického a environmentálneho inžinierstva
Radlinského 9, 812 37 Bratislava 1, mr.filcak@gmail.com

Fluidné katalyticke krakovanie predstavuje dosť rozšírený energeticky náročný proces, spracúvajúci vákuové olejové destiláty s cieľom ich konverzie na široké spektrum produktov. V práci sú použité prevádzkové údaje reálnej výrobne za niekoľko rokov, ktoré boli podrobenej selekcii, dosadeniu do vzorových výpočtov a automatizácii týchto vzorových výpočtov. Cieľom práce je zanalyzovať náklady na koks a paru a pokúsiť sa navrhnuť kroky na ich zníženie. Na úvod som sa zaoberal odhadom výťažku koksu, ktorý nie je priamo merateľný. Preto musí byť dopočítavaný bilancie spaľovania a analýzy zloženia spalín z regenerátora katalyzátora. Experimentálna časť kladie dôraz na premenlivosť zloženia koksu podľa spotreby stripovacej pary, ktorá desorbuje ľahké olejové zlúčeniny z povrchu častic katalyzátora. Preto sa jej deficit môže prejaviať vo zvýšenej tvorbe koksu. Principiálny výsledok práce je stanoviť obsah oleja v kokse a vyhodnotiť finančný efekt nižšej než projektovanej spotreby stripovacej pary v kontraste s tým vyvolaným nárastom obsahu oleja v kokse. Ďalšie závery vyplývajú z overenia parnej bilancie 3,5 MPa pary porovnaním vypočítaných spotrieb pary do 3 turbín s meranými príetokmi kondenzátorov pary. V závere práce som sa venoval návrhu dvoch výmenníkov tepla na ohrev napájacej vody vrátane návrhu regulačnej slučky.

Autor nedodal svúj príspěvek do uzáverky sborníku.

Stanovení dvoufotonových absorpčních průřezů Rhodaminu B a 6G

Silvie Hrbková
Martin Vala, Jan Koutný

Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická, ÚFSCH, Purkyňova 118, 612 00 Brno
xchrbkova@fch.vutbr.cz

Dvoufotonová absorpcie (2PA) je proces, při kterém dochází k současné absorpci dvou fotonů o poloviční energii, než jaká je potřeba při klasické jednofotonové absorpci. Pro vznik 2PA je nutný zdroj záření s vysokou hustotou toku fotonů, a z toho důvodu se pro 2PA využívají pulsní subpicosekundové lasery. Krátký laserový puls a delší vlnové délky dovolují zkoumání živých systémů, aniž by došlo k jejich poškození. Další přínos spočívá v možnosti zacílení paprsku do určitého bodu a tím k dosažení podstatně vyššího prostorového rozlišení.

Tyto výhody vedou k narůstajícímu uplatnění 2PA v oblastech nanotechnologií, fotodynamické terapie, fluorescenční mikroskopie, aj. Všechny aplikace 2PA závisí na vývoji nových materiálů s dobré prozkoumanými a optimalizovanými 2PA vlastnostmi.

Základní vlastnosti charakterizující vhodnost molekul pro 2PA je dvoufotonový absorpční průřez, který vyjadřuje schopnost molekuly absorbovat současně dva fotony s nízkou energií. Jednou z možností, jak 2PA průřez stanovit, je využít fluorescence po 2PA excitaci. Při tomto stanovení je zapotřebí mít dobře definován standard pro porovnání s neznámou látkou. 2PA průřezy jsou u běžných organických barviv již publikovány, nicméně jednotlivé výsledky se, s ohledem na použitou metodu a aparaturu, od sebe výrazně liší. To znamená, že stále existuje potřeba pro jejich přesné stanovení.

V praktické části tohoto příspěvku uvedeme postup a výsledky měření dvoufotonových absorpčních spekter Rhodaminu B a Rhodaminu 6G při excitačních vlnových délkách 750–1120 nm za použití pikosekundového laseru.

Tyto výsledky budou využity jako referenční standardy pro měření dalších látek.

Klíčová slova: dvoufotonová absorpcie, Rhodamin B, Rhodamin 6G, dvoufotonový absorpční průřez

Autor nedodal svůj příspěvek do uzávěrky sborníku.

Hybridné solárne články na plastovej PET podložke

*Bc. Matej Hvojnik
doc. RNDr. Milan Mikula, CSc.*

*Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie,
Ústav prírodných a syntetických polymérov.
Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
matej.hvojnik@gmail.com*

1 Úvod

Moderná spoločnosť stále čelí rastúcim obavám ohľadom klimatických zmien spôsobených spaľovaním fosílnych palív. Z dostupných obnoviteľných a čistých zdrojov energie, je slnečná energia najdostupnejšia a trvalá. V skutočnosti pokrytie plochy menšej ako 0,4 % svetovej plochy by malo postačovať pre zabezpečenie svetovej energetickej spotreby, za predpokladu 15% účinnosti premeny solárnej energie. Nie je preto prekvapením, že nedávno nastal prudký rozvoj fotovoltaických technológií. Fotovoltaické zariadenia na báze kryštaličkých, anorganických polovodičov dosiahli impozantný výkon premeny slnečnej energie s účinnosťou viac ako 28% pod priamym slnečným žiareniom. Avšak táto trieda fotovoltaiky trpí vysokými výrobňami nákladmi a nákladmi na materiál, čo má za následok dlhodobú návratnosť financií. To viedlo k vývoju lacnejších a výkonnejších solárnych článkov a výrobných metód ako je tlačenie z „kotúča na kotúč“ (roll to roll). Farbivom citlivý solárny článok (DSSC) bol dlhodobým kandidátom, ktorý splňal tieto požiadavky. Pre tuho-fázové (ssDSSC) sa predpokladalo, že je možné dosiahnuť účinnosť do 20%, pričom sa na výrobu článku použijú lacné plastové materiály, spracované pri teplotách nižších ako 150 °C a metódami roll to roll. Avšak aj cez početné zlepšenie elektrón transportujúcej anódy, pohlcovania svetla a materiálov transportujúcich dieru (HTM) ssDSSC článok zatial nenaplnil svoj potenciál a dosiahol najlepšiu účinnosť premeny energie na úrovni 7 %. Len nedávno, nový tip tuho-fázového hybridného solárneho článku s organicko-anorganickým absorbériom perovskitového typu ($\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$) dosiahol výrazné zvýšenie konverzie energie s účinnosťou na úroveň cca 17 %¹, čo vrhá nové svetlo na súčasný vývoj tuhofázových solárnych článkov včítane náhrady Ru-senzibilizátorov a otvára možnosti novej generácie zariadení.

2 Cieľ práce

Cieľom práce bolo pripraviť modelové DSSC články nízkoteplotným procesom na plastovej podložke včítane zapuzdrenia a pokúsiť sa pripraviť tuhofázový hybridný solárny článok s perspektívou využitia tlačových techník.

Mikroskopicky a spektroskopicky zhodnotiť pripravené vrstvy, zmerať záťažové I-V charakteristiky solárneho článku a stanoviť účinnosť premeny slnečnej energie na elektrickú.

3 Výsledky a diskusia

3.1 Klasický systém DSSC na sklenej podložke

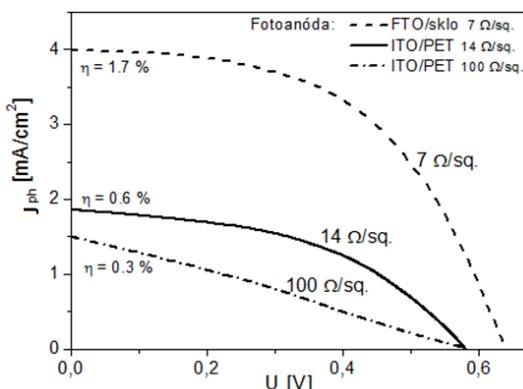
V prvom kroku sme pre porovnanie zhodovili klasický systém DSSC na sklenej podložke - nízkoteplotným procesom:

sklo /FTO /mp-TiO₂ /N719 /Iodolyt /Pt /FTO /sklo

pričom mp-TiO₂ bola termicky vytvrdzovaná 1 hodinu iba pri 120 °C, rovnako ako fotoanódy na plastových podložkách. Klasické systémy s jódovým elektrolytom nevyžadujú nevyhnutné blokačné kompaktné vrstvy TiO₂, pretože výmena náboja medzi I/I⁻ je slabá a teda nedochádza k vnútornému skratu cez poruchy (diery) v mezoporéznom TiO₂.

3.2 DSSC na plastovej podložke so sklenou protielektródu

Následne sme pripravovali najprv fotoanódu a neskôr aj protielektródu na plastových podložkách (ITO/PET). Na Obr. 1 môžeme porovnať DSSC systémy s plastovou a sklenou fotoanódou (pri stále sklenej protielektróde).



Obr. 1: I-V záťažové krivky DSSC pre rôzne vodičné (2 plastové a 1 sklená) podložky fotoanódy (pri sklenej Pt/FTO protielektróde vo všetkých prípadoch)

Pre plastové fotoanódy nastal značný pokles fotoprúdov, čo súvisí s vyššími sériovými odpormi podložiek, ale zrejme aj s ohybnosťou – flexibilnosťou substrátov a tým zhoršenou adhéziou a tiež únikom elektrolytu.

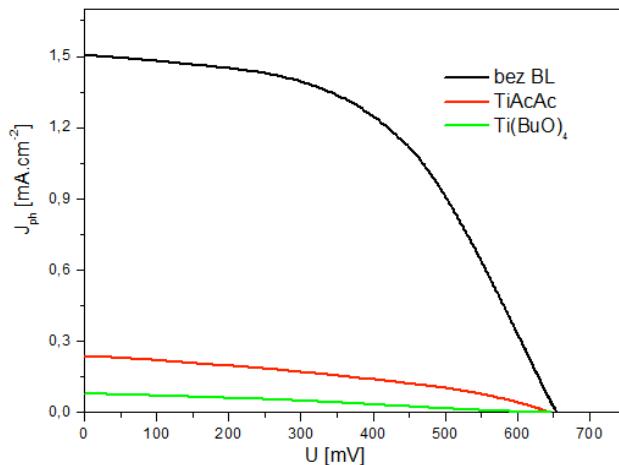
Pri substráte s vyšším odporom (100 $\Omega/\text{sq.}$) vidíme i zmenu (zhoršenie) tvaru – výrazné zníženie fill faktora (FF), čo jednoznačne súvisí s vyšším odporom ITO vrstvy a tým i zvýšením kontaktných odporov.

3.3 Plne plastové DSSC so zapuzdrením

V ďalšom kroku sme nahradili sklenú Pt/FTO protielektródu za uhlíkovú na plastovom podklade: C/ITO/PET, kvôli možnosti úplného zapuzdrenia do puzdriacej fólie a tak zamedzeniu úniku elektrolytu:

PET /ITO /SG-BL /mp-TiO₂ /N719 /Iodolyt /C /ITO /PET

Zmesná uhlíková (C) protielektróda bola pripravená ovrstvením nožom z pasty (PEDOT:PSS s funkcionálizovanými CNT). Zámerne sme zaviedli aj blokačnú, kompaktnú BL TiO₂ (SG-BL) vrstvu, ktorá nie je nevyhnutná pre iodolytové systémy, ale je klúčová pre tuho-fázové ssDSSC (resp. pre PSC), kde zamedzuje skratu cez tuhú HTM vrstvu.



Obr. 2: I-V záťažové krivky plne plastových DSSC s dvomi typmi blokačnej vrstvy (TiAcAc a Ti(BuO)₄) a bez nej (bez BL)

Ako vidno z Obr. 2, po aplikovaní blokačnej vrstvy došlo proti očakávaniu, k výraznému poklesu fotoprúdov a teda i poklesu účinnosti solárneho článku. Tento nepriaznivý pokles možno vysvetliť vysokým odporom sól-gél blokačných vrstiev, ktoré boli termicky spracované iba pri 120 °C (kvôli plastovej podložke).

3.4 Príprava PSC na PET podložke

V ďalšom kroku sme pripravili aj perovskitové solárne články (PSC), so štruktúrou:

PET /ITO /SG-BL /mp-TiO₂ /perovskit /Ag

kde podložná fotoanóda bola pripravená analogicky ako v DSSC systémoch. PSC však boli ako fotočlánky neúspešné, pretože nevykazovali žiadny fotoprúd (iba na úrovni tmavého prúdu). Tento neúspech prvých pokusov PSC na plastovej podložke možno vysvetliť buď nedokonalou prípravou perovskitovej vrstvy (dierami vo vrstve, ktoré sú miestami skratu po naparení Ag), alebo vysokým odporom SG vrstvy (ako sme zistili vyššie pri plastových DSSC), ktorá neplní funkciu polovodiča typu n (n-TiO₂).

Preto sme sa zamerali na kontrolu vlastností blokačnej vrstvy, teda SG-TiO_x vrstvy, ale i podložnej vrstvy.

3.5 Homogenita, morfológia a drsnosť podložných ITO vrstiev

Povrch ITO vrstvy na PET nie je bez porúch, pričom vodivejšie vrstvy sú podstatne viac poruchové, ako možno pozorovať z mikroskopických snímkov na Obr. 3 až 6.



Obr. 3: ITO (100 Ω/sq) $2,5 \times 2 \text{ mm}^2$



Obr. 4: ITO (100 $\Omega/\text{sq.}$) $0,65 \times 0,5 \text{ mm}^2$



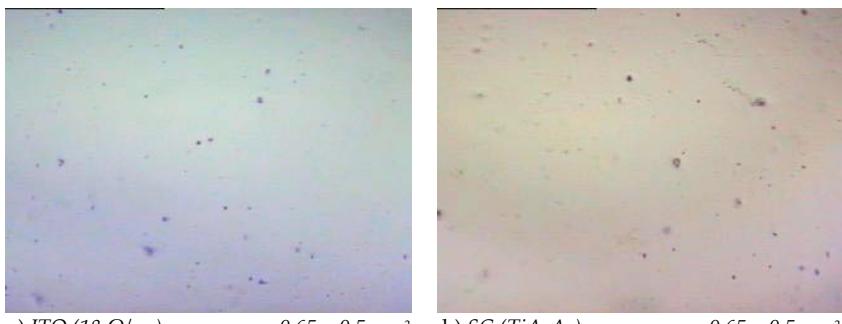
Obr. 5: ITO (14 $\Omega/\text{sq.}$) $2,5 \times 2 \text{ mm}^2$



Obr. 6: ITO (14 $\Omega/\text{sq.}$) $0,65 \times 0,5 \text{ mm}^2$

3.6 Kompaktnosť SG vrstiev

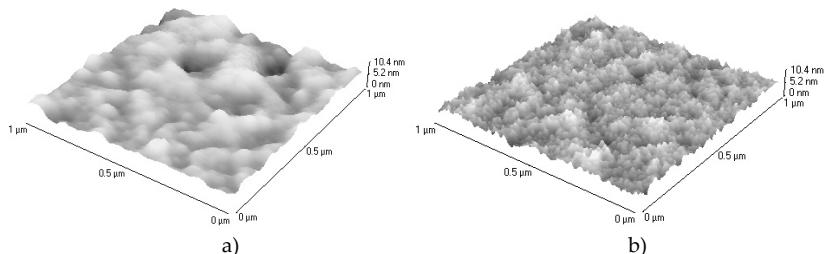
Podľa optického mikroskopu (Obr. 7) sa zdá, že SG vrstvy sú kompaktné, rovnomerne, bez prasklín a nezvyšujú počet porúch, ktoré sú v podložnej ITO vrstve.



a) ITO ($18 \Omega/\text{sq.}$) b) SG (TiAcAc) $0,65 \times 0,5 \text{ mm}^2$ $0,65 \times 0,5 \text{ mm}^2$

Obr. 7: Mikroskopické snímky ITO ($18 \Omega/\text{sq.}$) povrchu (a) a SG vrstvy (b) na rovnakej ITO PET fólii

Kompaktnosť SG sme overovali aj pomocou AFM sondovej mikroskopie, pričom sme skenovali plôšky mimo porúch viditeľných optickým mikroskopom. Ako vidno na Obr. 8, SG vrstva je kompaktná, dokonca s nižšou drsnosťou a jemnejšou štruktúrou.

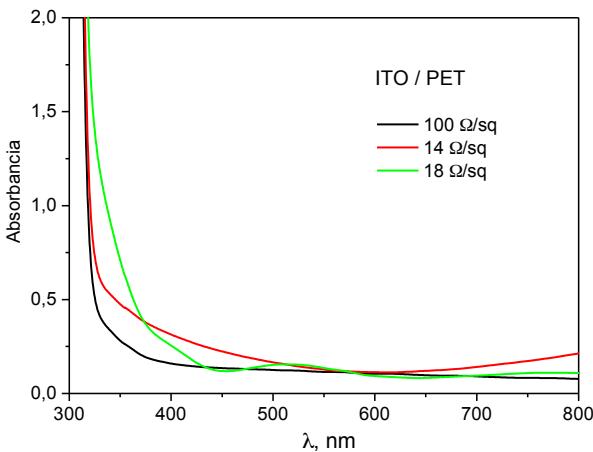


Obr. 8: AFM topografia podložky ITO (a) a sôl-gél vrstvy $\text{Ti}(\text{BuO})_4$ (b) na ITO/PET ($100\Omega/\text{sq.}$) v rovnakej škale $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m} \times 10 \text{ nm}$

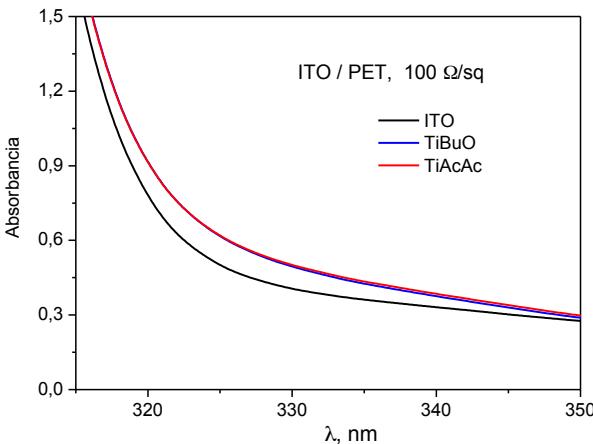
3.7 Spektrálne meranie vrstiev

Z absorpčných UV-Vis. spektier možno usúdiť, že ITO vrstvy sú číre so slabou interferenciou, najmä vrstvy $14 \Omega/\text{sq.}$ a $18 \Omega/\text{sq.}$. Prudký nárast pri 320 nm spôsobuje hlavne hrubá podložná PET vrstva Obr. 9.

Zvýšenú absorpciu pod 350 nm z dôvodu tenkej SG vrstvy možno pozorovať na Obr. 10, čo je v zhode s očakávaním.



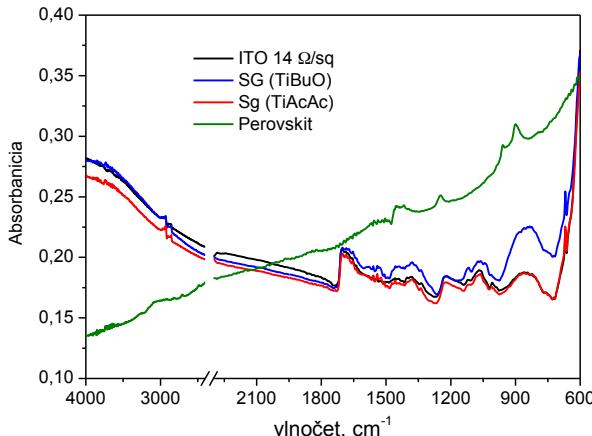
Obr. 9: UV-Vis. spektrá rôznych ITO podložiek



Obr. 10: UV spektrá ITO/PET (100 Ω/sq) s SG vrstvou $\text{Ti}(\text{BuO})_4$ a TiAcAc

Na ATR IR spektrách systému SG/ITO/PET nenachádzame výrazné absorpčné pásy, ktoré by zodpovedali SG vrstve, čo súvisí s tým, že Ti-O vibrácia je až pod hranicou 600 cm^{-1} . Absorpčné pásy PET nie sú viditeľné, pretože hĺbka prieniku IR lúča pri Ge kryštáli je zrejme menšia ako hrúbka 14 ohmovoje ITO vrstvy.

Absorpcia perovskitu je spojité v celej oblasti spektra a pripomína absorpciu uhlíkových materiálov (nárast absorbancie s rastom vlnovej dĺžky v celom spektre), čo súvisí s jeho elektrickou vodivosťou.



Obr. 11: FTIR spektrá SG vrstiev a perovskitu na ITO (100 Ω/sq .)

4 Záver

- Na plastovej podložke boli pripravené modelové solárne články typu DSSC a PSC.
- Pre porovnanie boli pripravené aj klasické DSSC články na sklenej podložke, resp. plastové s protielektrídom na skle.
- Účinnosť článkov DSSC na plastovej podložke bola vždy nižšia ako na sklenej podložke.
- Blokačná sól-gél vrstva spracovaná pri 120 °C výrazne znižovala účinnosť článkov DSSC zrejme kvôli jej vysokému odporu.
- Modelový PSC na plastovej podložke nevykazoval žiadnu fotoaktivitu zrejme kvôli blokačnej vrstve s vysokým odporom.
- Podložné vrstvy ITO sa líšia nielen hrúbkou a vodivosfou, ale aj početnými vnútornými poruchami.
- Blokačné SG vrstvy sú bez väčších porúch a nezvyšujú počet porúch v podložnej ITO vrstve.

5 Literatúra

1. Burschka, J. et al.: Nature 2013, 499, s. 316 –319.

Podčakovanie

Dovoľujem si podčakovať vedúcemu práce doc. RNDr. Milanovi Mikulovi, CSc. za odborné vedenie, ústretovosť, cenné rady a ochotu pri vypracovaní.

Izolácia vláknitých materiálov z lignocelulózových materiálov s použitím hlbokých eutektických zmesí

*Filip Kalman
Andrea Škulcová, Milan Vrška*

*Slovenská technická univerzita v Bratislave,
Fakulta chemickej a potravinárskej technológie,
Ústav prírodných a syntetických polymérov
Oddelenie dreva, celulózy a papiera
Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
filip.kalman2@gmail.com*

1 Úvod

Súčasné technológie spracovania lignocelulózových surovín na vláknitý materiál spotrebúvajú veľké množstvá energií, či už vodnej alebo tepelnej a produkujú značné množstvá škodlivých kvapalných a plynných emisií, ktoré značnou mierou poškodzujú životné prostredie. V roku 2012 spustila CEPI projekt pod názvom Two Team Project. Jeho úlohou bolo nájsť nové technológie pre celulózo- papierenský priemysel, ktoré by znížili škodlivý vplyv na životné prostredie. Dva tímy vybrali osem technologických postupov, ktoré by dané nedostatky riešili. Ako najdôležitejšia sa hodnotila problematika použitia hlbokých eutektických zmesí (ďalej DES- Deep Eutectic Solvents). DES boli prvýkrát popísané v roku 2003. Predstavujú novú triedu iónových kvapalín. Najväčšou odlišnosťou od iónových kvapalín je spôsob väzby v zmesiach. Pre iónové kvapaliny je typický vznik iónovej väzby medzi iónom s delokalizovaným nábojom a veľkým organickým katiónom, ktorý zapríčinuje kvapalnosť zmesi aj pri nízkych teplotách. Pre DES je zas typický vznik vodíkovej väzby medzi donorom a akceptorom vodíkovej väzby. Výhodou použitia DES je ich ľahká príprava zmiešaním dvoch prekurzorov v tuhom stave a následné rozpustenie pri zvýšenej teplote. Ďalšou z výhod je ich nízka toxicita a biodegradovateľnosť keďže prekurzory týchto sú látky prírodnej povahy. DES boli doteraz aplikované v oblasti elektrozpúšťania, ako disperzné prostredie pre prípravu nanočastíc, syntézne médium pri organických syntézach, ale aj ako katalyzátory. Výhodou použitia DES ako delignifikačného činidla je jeho selektívne rozpúšťanie lignínu, zatiaľ čo celulóza je v DES absolútne nerozpustná. Proces delignifikácie prebieha pri nižších teplotách ako pri súčasných technológiách, čo má za následok vyššiu kvalitu získaných vlákien z dôvodu nižšej termickej degradácie.

2 Experimentálna časť

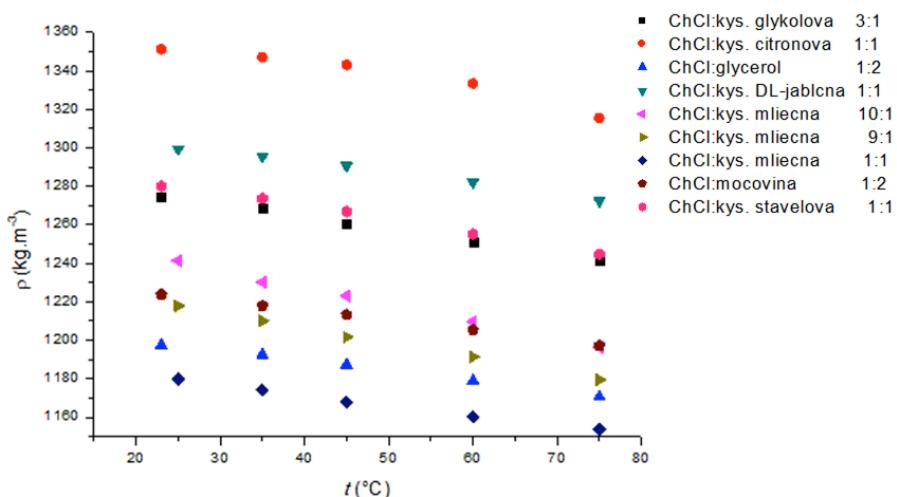
Na základe vypracovanej rešerši bolo zvolených na prípravu osem zmesí, všetky s obsahom cholín chloridu. DES boli pripravované pomocou rotačnej vákuovej odparky z dôvodu zabránenia prístupu vzdušnej vlhkosti. Teploty prípravy zmesí boli vybrané na základe dostupnej literatúry a podľa termickej stability východiskových látok. Požadované teploty boli zabezpečené pomocou vodného kúpeľa. Po príprave vybraných zmesí boli stanovené základné fyzikálne vlastnosti – hustota, viskozita a index lomu. Index lomu bol meraný pomocou analógového Abbeho refraktometra.

Tabuľka 1: Hodnoty indexu lomu pripravených DES pri teplote 25°C

Zmes	Molárny pomer	$n_d(25 \pm 1^\circ\text{C})$
ChCl: kyselina mliečna	1:1	1,4810
ChCl: kyselina mliečna	1:9	1,4432
ChCl: kyselina mliečna	1:10	1,4426
ChCl: kyselina glykolová	1:3	1,4709
ChCl: kyselina šfavelová	1:1	1,4662
ChCl: močovina	1:2	1,5120
ChCl: glycerol	1:2	1,4781
ChCl: kyselina citrónová	1:1	1,4968

Hodnoty indexu lomu nám poslúžia na stanovenie čistoty pripravených zmesí.

Hustota bola stanovená pyknometricky, pri piatich rôznych teplotách: 24°C, 35°C, 45°C, 60°C, 75°C.



Graf 1: Teplotná závislosť hustoty pripravených DES

Všetky zmesi vykazovali hustotu vyššiu ako voda. Najvyššia hustota bola stanovená pre zmes cholín chlorid: kyselina citrónová v molárnom pomere 1:1. Najnižšia hustota bola stanovená pre zmes cholín chlorid: kyselina mliečna (1:1). Hustota pri tejto zmesi klesá s narastajúcim obsahom cholín chloridu.

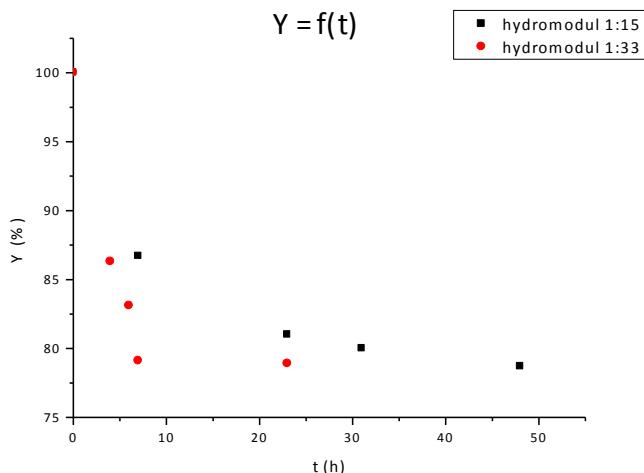
Viskozita bola stanovená pomocou Ubbelohdeho viskozimetra pri teplote 60 °C.

Tabuľka 2: Hodnoty kinematickej a dynamickej viskozity DES pri teplote 60 °C

DES	Molárny pomer	ν [mm ² s ⁻¹]	η [mPa.s]
ChCl: kys. mliečna	1:1	56,44	65,49
ChCl: kys. mliečna	1:9	11,70	13,94
ChCl: kys. mliečna	1:10	11,49	13,90
ChCl: kys. glykolová	1:3	31,54	39,47
ChCl: kys. šťavelová	1:1	27,96	35,09
ChCl: močovina	1:2	76,32	88,55
ChCl: glycerol	1:2	18,18	21,43

Pripravené zmesi vykazujú relatívne vysokú viskozitu v porovnaní s viskozitou vody. Najnižšiu viskozitu mala zmes cholín chlorid: kyselina mliečna (1:10). Viskoza tejto zmesi klesá so znižujúcim sa obsahom cholín chloridu. Pre viskozitu pozorujeme opačný trend ako pri hustote tejto zmesi.

Zmes cholín chlorid: kyselina mliečna (1:10) bola použitá na delignifikáciu. Ako surovina bola použitá slama. Pracovali sme pri teplote 75 °C. Vyhrievanie bolo zabezpečené pomocou olejového kúpeľa s mechanickým miešaním cely so zmesou suroviny a DES. Pracovali sme pri dvoch hydromoduloch deliginifikácie: 1:15 a 1:33.



Graf 2: Závislosť výťažku od času delignifikácie pre dva rôzne hydromodoly

Z grafu 2 môžeme pozorovať, že zvýšenie hydromodulu malo pozitívny vplyv na množstvo odstráneného lignínu. Po čase 7 hodín bol výfažok pri hydromoduli 1:15 86,3 % a pri hydromoduli 1:33 bol výfažok 79,1 %, čo svedčí o zvýšení množstva odstráneného lignínu. Pri dlhšom čase delignifikácie vyšší hydromodul nemal výrazný vplyv na množstvo odstráneného lignínu.

3 Záver

Z vykonanej rešerše sa vytypovali vhodné zmesi DES, ktoré by bolo vhodné použiť pre delignifikáciu lignocelulózových surovín. Pripravili sme zmesi cholín chloridu s kyselinou mliečnou, glykolovou, šťavelovou, citrónovou, DL- jablčnou a močovinou. Určili sme hustoty a viskozity pripravených zmesí pri teplote 60 °C. Ako najvýhodnejšia sa zdá byť zmes cholín chloridu a kyseliny mliečnej v pomere 10:1. Vzhľadom na cenu chemikálií však bude nutné vykonať optimalizáciu technologických podmienok použitia sledovaných zmesí.

Väčšina zmesí má pomerne vysokú viskozitu, čo nepriaznivo vplýva na rýchlosť impregnácie pred delignifikáciou. Keďže viskozita klesá s narastajúcou teplotou, impregnáciu budeme musieť vykonávať pri zvýšenej teplote. Zvýšenie tlaku bude taktiež pozitívne vplývať na rýchlosť impregnácie DES.

Navrhované zmeny nám skrátia čas impregnácie, ale budú mať negatívny vplyv na ekonomickej podmienky spracovania biomasy.

4 Literatúra

1. KROON, M. C; FRANCISCO, M.: Low-transition- temperatre mixtures (LTTMs): A new generation of designer solvents, 2013.
2. KALMAN, F.: Štúdium využitia eutektických zmesí k izolácii vláknitých materiálov z lignocelulózových materiálov, Bakalárská práca, FCHPT STU,

Riešenie tejto práce bolo realizované aj vďaka podpore v rámci riešenia projektu APVV 0850-11 a APVV 14-0393, financovaného Agentúrou na podporu výskumu a vývoja (APVV), Slovensko a projektu VEGA 1/0775/13.

Effect of phosphates on the hydration process of alkali activated materials

*Kateřina Komosná
Ing. Lukáš Kalina, Ph.D.*

*Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická,
Ústav chemie materiálů, Purkyňova 118, Brno
xckomosnak@fch.vutbr.cz*

Tato studie se soustředí na možnosti ovlivnění doby tuhnutí alkalicky aktivovaných systémů na bázi vysokopevní strusky. Cílem práce bylo najít takový retardér tuhnutí, který nejvíce prodlouží dobu tuhnutí a zároveň negativně neovlivní mechanické vlastnosti alkalicky aktivovaného materiálu.

V experimentální části byly nejdříve připraveny vzorky ze směsi strusky, vodního skla, vody a přídavku dané přísady v různém množství. Poté byly testovací vzorky podrobeny zkouškám pevnosti v tuhu za ohýbu a pevnosti v tlaku. Dále byla u těchto směsí zjištěna doba tuhnutí pomocí Vicatova přístroje. Kvůli sledování průběhu tuhnutí byly směsi měřeny kalorimetricky a pro bližší pohled na strukturu povrchu vzorku a rozmištění retardéra tuhnutí v něm, byly směsi pozorovány na skenovacím elektronovém mikroskopu.

Autor nedodal svůj příspěvek do uzávěrky sborníku.

Possibilities of Using Plasticizers in Alkali-Activated Systems

*Markéta Langová
Ing. Lukáš Kalina, Ph.D.*

*Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická,
Ústav chemie materiálů, Purkyňova 118, Brno
xckmosnak@fch.vutbr.cz*

Tato práce se zabývá studiem vlivu plastifikátorů a superplastifikátorů na alkalicky aktivovanou vysokopevní strusku. Tyto komerčně dostupné přísady byly dávkovány v různém procentuelním zastoupení. Cílem této práce je nalézt vhodný plastifikátor nebo superplastifikátor, který by zlepšil jak zpracovatelnost, tak mechanické vlastnosti alkalicky aktivované strusky. Dále byl posouzen vliv těchto přísad na pevnost v tlaku a pevnost v tahu za ohybu alkalicky aktivované strusky. Na závěr se pomocí infračervené spektrometrie studuje chování plastifikačních přísad v alkalickém prostředí.

Autor nedodal svůj příspěvek do uzávěrky sborníku.

Tepelné vlastnosti sacharózy

*Kateřina Pecháčková
prof. Ing. Oldřich Zmeškal CSc., Ing. Lucie Trhlíková*

*Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická,
Purkyňova 118, 612 00 Brno, Česká republika
xcpechackova@fch.vutbr.cz*

Tato práce je zaměřena na studium tepelných vlastností sacharózy. Jedná se o tepelnou kapacitu, tepelnou vodivost a tepelnou difuzivitu. Tepelné vlastnosti materiálů souvisejí s fázovými přeměnami, které se dají využít v praxi. Pro aplikaci je nejprve však zapotřebí zkoumat a určit tepelné vlastnosti závisející na fázových přeměnách v průběhu zahřívání a ochlazování.

Metody, které se využívají ke studiu vlastností tepelných materiálů, jsou metody tranzientní. Ty podávají veškeré informace o materiálech, které jsou zkoumány prostřednictvím jejich závislosti na teplotě. Při měření byly použity pulzní a skokové tranzientní metody. Jejich princip spočívá v tom, že je vytvořeno uvnitř studovaného materiálu velice malé množství tepla. A následným měřením odezvy tohoto tepla můžeme stanovit dané termofyzikální parametry.

V experimentální části je popsán průběh všech experimentů a rovněž jsou diskutovány výsledky a způsob vyhodnocení experimentu.

Klíčová slova: Tepelné parametry, tranzientní metody, sacharóza

Autor nedodal svůj příspěvek do uzávěrky sborníku.

Adheze tenkých vrstev plazmových polymerů z monomeru tetravinylsilanu

Tomáš Plichta

Vladimír Čech

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie materiálů.

Purkyňova 118, 612 00 Brno, Česká Republika

xcplichta@fch.vutbr.cz

1 Úvod

V moderních technologiích se uplatňují tenké vrstvy v široké oblasti, a to nejen v důsledku zlepšení vlastností a miniaturizace, ale především však při povrchových úpravách ve strojírenství a energetice, průmyslu a odvětvích mikroelektroniky, polovodičů, optiky, také nachází využití při výrobě senzorů, ukládání dat a MEMS zařízení^{1, 2, 3}.

Stále se rozvíjející metoda plazmochemické depozice z plynné fáze (PE CVD) na bázi organokřemičitanů je jednou z mnoha metod sloužících pro přípravu tenkých vrstev. Mezi výhody přípravy plazmových polymerů touto metodou patří reprodukovatelnost a možnost nadepnování vrstev s rozdílnými vlastnostmi již pouhou změnou depozičních podmínek, mezi které patří změna výkonu, tlaků nebo průtoku monomeru či dalších plynů. Mezi vlastnosti těchto vrstev patří například jejich nerozpustnost, tepelná odolnost, výborná adheze k substrátu a mnohdy i chemická odolnost vůči kyselinám a zásadám⁴.

Kompozity patří mezi pokročilé materiály tvořené z matrice a výztuže, kterou bývají zpravidla vlákna nebo částice. Právě skleněná vlákna jsou nejčastěji používanou výztuží. Jelikož je nejdůležitějším aspektem právě adheze těchto vláken a matrice v důsledku účinného přenosu napětí z matrice do vlákna, používá se modifikace povrchu skleněných vláken pomocí depozice tenké vrstvy organokřemičitanů metodou PE CVD. Výhodou tenké vrstvy plazmového polymeru organokřemičitanů je vznik vazeb, kdy tyto vazby jsou schopny se vázat jak na skleněná vlákna, tak na polymerní matrici, a tím zvýšit adhezi.

V experimentální části je podán bližší popis přípravy a technik charakterizace tenkých vrstev plazmových polymerů z čistého monomeru tetravinylsilanu a dvou směsí tetravinylsilanu s kyslíkem nebo argonem na plošné substráty v depoziční aparatuře.

Cílem práce bylo stanovit míru adheze takto připravených vzorků, a to pomocí vrypové zkoušky. Na základě takto získaných dat posoudit reprodukovatelnost výsledků s ohledem na čistotu substrátů, depoziční podmínky a stárnutí vrstev. Závěrem tyto výsledky byly korelovány s měřenými pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM) za účelem posouzení nejen míry adheze vrstvy k substrátu, ale především ke zhodnocení charakteru porušení vrstev či jejich delaminace.

2 Experimentální část

2.1 Příprava vzorků a depoziční systém

Křemíkový wafer byl použit jako substrát, jedná se o wafer typu P s prostorovou orientací (1 0 0), jehož průměr je $150 \pm 0,2$ mm a tloušťka $600 \mu\text{m}$. Pomocí laseru byl tento wafer rozřezán a poté manuálně rozlámán na vzorky o rozměrech $10 \times 10 \times 0,6$ mm. Takto nachystané vzorky byly čištěny ultrazvukem v 96% ethanolu po dobu 15 minut.

Použitým depozičním systémem byla vysokovakuová aparatura, která je konstruována pro plazmochemické depozice metodou PE CVD s kapacitně vázaným plazmatem. Hlavní částí aparatury je cylindrická reakční komora o rozměrech 25×25 cm, uvnitř které jsou dvě planparalelní elektrody, a to dolní elektroda o průměru 114 mm a horní elektroda s průměrem 135 mm, vzdálenost elektrod od sebe je 58 mm. Horní elektroda plní funkci takzvané sprchy, kterou do reaktoru proudí plyny. Spodní otočná elektroda je pracovní, přivádí se na ni radiofrekvenční výkon od 1 až do 1000 W o frekvenci 13,56 MHz generátorem Cesar 1310. Do pracovní elektrody se zasouvají držáky (tzv. lodičky) se vzorky. Tato elektroda je uzpůsobena pro simultánní depozici šesti vzorků, ty se do elektrody, která je uprostřed reakční komory, umísťují z oddělovací komory, která je pod vakuum, pomocí magnetického manipulátoru. K této aparatuře je také připojen spektroskopický elipsometr UVISEL, který se používá pro měření rychlostí růstu těchto vrstev v průběhu depozic, nebo až jejich finální tloušťky a také pro zjišťování optických parametrů připravených vrstev plazmových polymerů.

Nejdůležitějším požadavkem pro přípravu vrstev je vyčerpání aparatury na základní vakuum pomocí čerpacího systému, kdy tato hodnota tlaku je v rozmezí $1 \cdot 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-5}$ Pa. Po umístění vzorků upevněných v lodičkách pomocí magnetického manipulátoru do pracovní elektrody je nejprve potřeba stanovit vlastnosti čistých substrátů pomocí spektroskopického elipsometru, za účelem získání hodnoty nativní vrstvy SiO₂. Následně je zahájena předúprava pomocí argonového plazmatu při výkonu 5 W, 10 minut, průtoku argonu 10 sccm a tlaku v reakční komoře 5,7 Pa. Tato předúprava slouží k očištění substrátů a částečné aktivaci povrchu Si waferu, což vede ke snadnějšímu navázání fragmentů monomeru TVS při depozici. Poté následuje vyčerpání reakční komory na základní vakuum. Po nalaďení požadovaného průtoku monomeru a případně i argonu nebo kyslíku a po dodání přízpusobovacího člena může být započata vlastní plazmová polymerace zapálením výboje při požadovaném výkonu, tlaku v reakční komoře 2,7 Pa a daných průtocích plynů. V rámci této práce byly vzorky deponovány při pulzním režimu výboje, kdy je rozhodující veličinou efektivní výkon, ten je definován vztahem:

$$P_{\text{ef}} = P_{\text{celkový}} \cdot \frac{t_{\text{on}}}{t_{\text{on}} + t_{\text{off}}},$$

kde $P_{\text{celkový}}$ je maximální dodaný výkon, t_{on} je doba trvání jednoho pulsu, kdy je výkon dodáván, a t_{off} doba mezi dvěma pulsy, kdy výkon není dodáván. Doba jednoho pulsu používaná při depozicích byla 1 ms. Po skončení depozice je ponechán aparatuřu proudit argon k ustálení jako ochranná atmosféra po dobu jedné hodiny a následně jsou vzorky opět proměřeny spektroskopickou elipsometrií za účelem získání informací o optických parametrech a především pak tloušťce vrstvy. Vzorky se nechají do dalšího

dne v reakční komoře, aby nedošlo k modifikaci vrstvy při kontaktu reaktivních radikálů se vzduchem, a následně jsou vzorky vyndány a připraveny pro další analýzy.

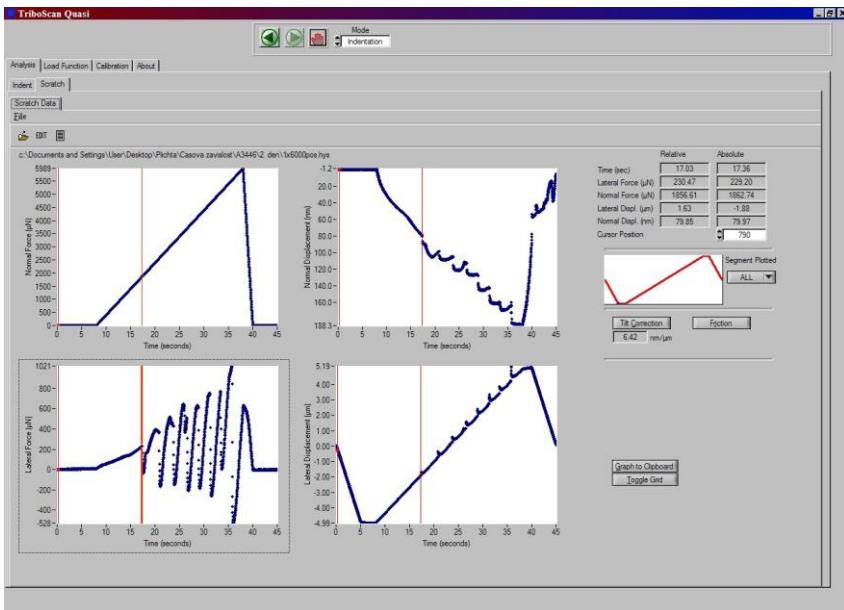
2.2 Vrypová zkouška

Vrypové zkoušky byly měřeny na skenovacím sondovém mikroskopu NTEGRA Aura od firmy NT-MDT, měření jako takové bylo prováděno pomocí speciální hlavy TriboScope TS-75 od firmy Hysitron Inc., zabudovatelné právě na tento mikroskop, která slouží pro indentační měření. Taktéž stejnou hlavou bylo provedeno orientační skenování povrchu vzorků před provedením i po provedení vrypu. Pro následné detailní skenování byla použita metoda mikroskopie atomárních sil.

Nachystaný 100 nm vzorek nalepený na ocelové podložce byl umístěn na skener s kapacitními senzory, následně byla na mikroskop umístěna hlava TriboScope a provedena kalibrace převodníku pro pohyb v ose x a z pomocí softwaru TriboScan 8.0. Tento program je plně zkoordinován s ovládacím softwarem Nova SPM mikroskopu, ale také veškerou obslužnou elektronikou. Kalibrace převodníku probíhá ve vzduchu v každé ose zvlášť, v důsledku této kalibrace dojde ke změně pěti konstant ovlivňujících měření. Zátežová funkce byla zvolena s provedením vrypu odspodu nahoru s postupným nárůstem normálové síly od 0 mN až po maximální nastavenou hodnotu, která u všech vrypů odpovídala 6 mN, maximálně je možné použít až 10 mN. Všechny vrypy v této práci byly provedeny v délce 10 μm , poté provedení vrypu vypadá tak, že hrot ze své výchozí pozice se posune 5 μm dolů, kde hrot prostupuje vrstvou ve směru dané metody odspodu nahoru a v důsledku zvyšování normálové síly se postupně zanořuje do vrstvy, až do vzdálenosti 5 μm od výchozí pozice, zde se odtáhne a vrátí zpět do základní polohy. Dalším nastavitelným parametrem je čas vrypu, který odpovídá 30 s.

Po nastavení těchto požadavků v programu TriboScan 8.0, byla přeskenována plocha pomocí hlavy Hysitron s diamantovým kono-sférickým hrotom o poloměru zakřivení 1 μm v kontaktním módu, skenování povrchu je ovládané přes program Nova. Po provedení pěti vrypů, bylo provedeno opět orientační přeskenování vrypů. Jak již bylo zmíněno, přesnější snímky těchto vrypů byly získány AFM mikroskopem. Veškeré skenování probíhalo v kolmém směru na vrypy.

Vyhodnocení vrypů probíhalo opět v programu TriboScan 8.0 (*Obrázek 1*), kdy byly získány grafy obsahující informace o laterálních a normálových silách, dále laterálním a normálovém posunu. Z těchto zátežových křivek byla odečtena kritická hodnota normálové síly, při které došlo k přerušení spojitosti, a tedy selhání adheze.



Obrázek 1: Uživatelské okno programu TriboScan s vyhodnocováním naměřených zátežových křivek pro určení selhání adheze.

2.3 Mikroskopie atomárních sil (AFM)

Měření mikroskopie atomárních sil bylo opět prováděno na přístroji NTEGRA Aura s ovládací elektronikou a řídícím počítačem se softwarom Nova. Vzorek byl opět umístěn na magnetický podstavec skeneru a skenovaná plocha byla předběžně vybrána optickým mikroskopem, který je upevněn k základní jednotce mikroskopu NTEGRA. Skenovat lze buď pomocí vzorkového podstavce, nebo pomocí skenovací hlavy. Topografické mapy v této práci byly získány skenováním v semi-kontaktním módu základní skenovací hlavou. Ve spodní části této hlavy je upevněno raménko s hrotom, použitá raménka s hroty byly typu NSG-03 o tuhosti $0,3\text{--}6,06 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ a rezonanční frekvenci $47\text{--}150 \text{ kHz}$ s poloměrem hrotu 10 nm . Nastavení laserového paprsku bylo provedeno po zapnutí softwaru Nova a řídící elektroniky. Následně bylo vybráno pomocí optického mikroskopu místo s vrypy, byly zadány parametry umožňující skenovat v semi-kontaktním módu a po přiblížení hrotu k povrchu vzorku následovalo skenování v horizontálním směru. Byly získány topografické snímky, dále byl získán amplitudový snímek, který je výsledkem měření proudového signálu, který je potřebný pro překonání dané nerovnosti vzorku. Vybrané snímky spolu s výškovými profily byly dále zpracovány v obrázkovém editoru programu Nova.

3 Výsledky

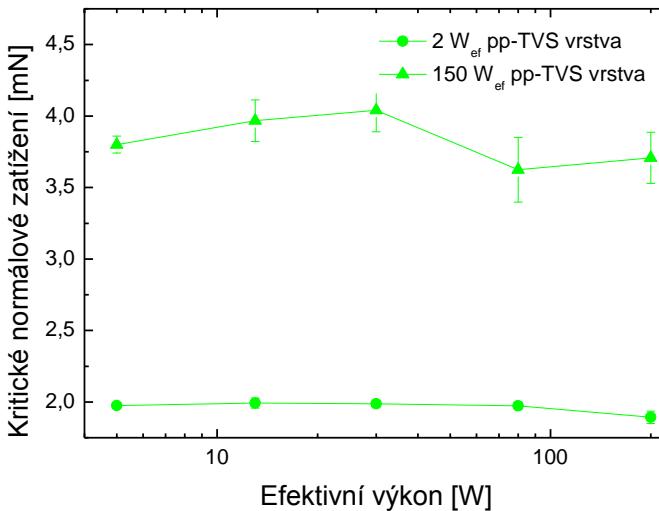
Připravené vzorky byly jak ze samotného tetravinylsilanu s nastaveným průtokem 3,8 sccm, tak ze dvou jeho směsí. První směs tvořil TVS o průtoku 0,3 sccm a argon s průtokem 3,5 sccm, druhá směs byla tvořena TVS (0,3 sccm) a kyslíkem (3,5 sccm). Výkon při argonové předúpravě byl nastaven 5 W, kromě série vzorků, kdy byla sledována hodnota kritické normálové sily v závislosti na výkonu této předúpravy. Dále byly připraveny tři výkonové série se změnou výkonu v rozsahu 2–150 W z TVS a dvou již zmíněných směsí. Pro všechna měření byly použity vzorky ze spodní elektrody z pozice e.

Na každém vzorku bylo provedeno uprostřed vzorku deset vrypů a z průběhu záťěžových křivek byla odečtena hodnota kritického normálového zatížení, ta odpovídá síle, při které dochází na záťěžových křivkách k první výrazné fluktuaci laterální složky síly, korelované se selháním adheze. Kritické normálové zatížení je mírou adheze dané vrstvy k substrátu. Z takto získaných deseti hodnot byl spočítán průměr a dále směrodatná odchylka, poté byly v programu OriginPro z těchto hodnot připraveny grafy závislosti.

Z důvodu simultánní depozice šesti vzorků byla provedena vrypová zkouška uprostřed vzorků směsi TVS a argonu deponované při efektivním výkonu 2 W připravených v pozicích elektrody a – f, tloušťce 102–104 nm. Z výsledku měření bylo zjištěno, že naměřené hodnoty jsou v rozmezí $4\,609 \pm 161\,\mu\text{N}$ (pozice f) až $4\,906 \pm 129\,\mu\text{N}$ (pozice a) se střední hodnotou $4\,812 \pm 168\,\mu\text{N}$. Směrodatná odchylka odpovídá přibližně 3,5 % ze stanovené hodnoty. Velikost směrodatné odchylky souvisí s mírou homogenity plazmatu v pozicích a – f a vlastní chybou vrypové zkoušky. Nízká hodnota směrodatné odchylky svědčí o dobré reprodukovatelnosti výsledků měření na simultánně připravených vzorcích.

Zároveň u vzorku z pozice e ze stejné depozice byla provedena měření pro pět míst v rámci jednoho vzorku za účelem zjištění reprodukovatelnosti výsledků měření vrypové zkoušky. Měření byla provedena uprostřed a v rozích vzorku, v každé poloze na vzorku bylo provedeno standardně deset vrypů. Střední hodnota měření byla stanovena na $4\,919 \pm 115\,\mu\text{N}$, směrodatná odchylka odpovídá přibližně 2 %. Minimální hodnota byla $4\,867 \pm 98\,\mu\text{N}$ a maximální byla rovna $4\,950 \pm 124\,\mu\text{N}$. Ze zpracovaných výsledků vyplývá, že stejně jako nezáleželo na vzorku, ze které pozice v elektrodě byl použit pro měření, tak také nezáleží na přesném místě, kde byla vrypová zkouška na vzorku provedena. Zjištěná směrodatná odchylka je totiž zanedbatelná.

Díky procesu předúpravy argonovým plazmatem, která slouží k očištění substrátů a aktivaci povrchu waferu, dochází ke snadnějšímu navázání fragmentů monomeru TVS při depozici. Z tohoto důvodu byla provedena studie vlivu výkonu dodávaného výboji argonového plazmatu na hodnotu kritického normálového zatížení jako míry adheze. Výkon byl dodáván v kontinuálním režimu po dobu odpovídající 10 minutám při průtoku Ar 10 sccm. Hodnoty dodávaného výkonu byly nastavovány od standardních 5 W, dále 13 W, 30 W, 80 W až po nejvyšší výkon 200 W. Na takto předupravené substráty byly nadepnovány vrstvy z čistého TVS a efektivním výkonu 2 W a 150 W. Byly provedeny vrypové zkoušky a graf těmito výsledky je zobrazen na Obrázku 2.



Obrázek 2: Graf závislosti kritického normálového zatížení na výkonu při předúpravě substrátu pomocí argonového plazmatu pro pp - TVS vrstvy.

Z grafu na Obrázku 2 je patrné, že změna výkonu dodávaného plazmatu při argonové předúpravě není významná a nemá prokazatelný vliv na hodnotu kritického normálového zatížení, výsledky pro dané vzorky se liší pouze v rozsahu odchyly měření vrypové zkoušky. Střední hodnota série TVS deponované při 2 W je $1964 \pm 46 \mu\text{N}$. Rozmezí naměřených hodnot je od $1893 \pm 43 \mu\text{N}$ do $1992 \pm 35 \mu\text{N}$. Pro sérii vzorků deponovaných při 150 W se střední hodnota rovná $3909 \pm 293 \mu\text{N}$, rozmezí naměřených hodnot je od $3624 \pm 227 \mu\text{N}$ do $4041 \pm 152 \mu\text{N}$. Je možné usuzovat, že hodnota dodávaného výkonu 5 W při standardní předúpravě je dostatečná.

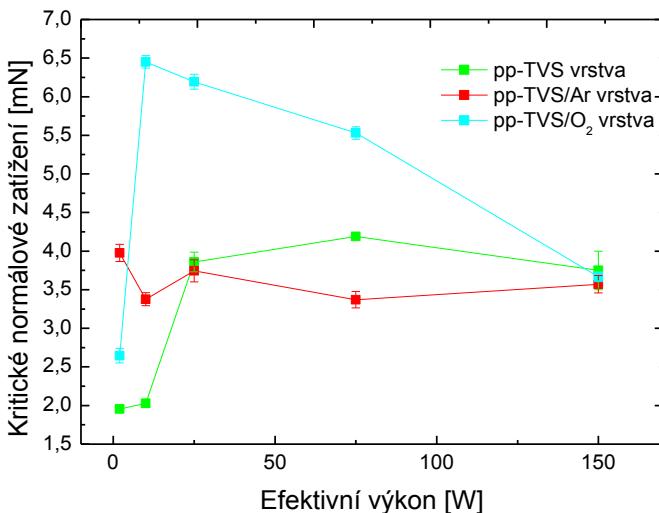
Byly připraveny tři výkonové série, u nichž byl efektivní výkon zvyšován od 2 W, dále 10 W, 25 W, 75 W až po 150 W, jelikož tato hodnota obecně může zvýšit adhezi tenké vrstvy k substrátu. Poté byla provedena vrypová zkouška a zjištěna hodnota kritického normálového zatížení, souhrnný graf závislosti jednotlivých sérií je zobrazen na Obrázku 3.

Z tohoto grafu je patrné, že u vrstev z čistého TVS dochází ke zlepšení adheze spolu se zvyšováním efektivního výkonu až do výkonu 75 W, u tohoto výkonu je patrné dosažení jistého maxima. Pro vyšší efektivní výkon, který odpovídá 150 W, lze pozorovat mírný pokles, tato změna však není významná. Střední hodnoty kritického normálového zatížení pro výkony vyšší než 25 W se mění jen v rámci cca 10 %, což je pouze rozsah chyby měření, jenž je akceptovatelný^{5, 6}. Tento mírný pokles však může být způsoben vznikem vyššího vnitřního pnutí v těchto vrstvách. Navýšení kritického normálového zatížení u vzorků deponovaných při výkonu 25 W a vyšším oproti vzorkům při 2 W a 10 W je pravděpodobně způsoben vlivem většího výkonu na větší fragmentaci monomeru, čímž dochází i k většímu zesíťování vzniklého plazmového polymeru.

Zesíťování má také vliv na modul pružnosti, který ovlivňuje hodnotu kritického normálového zatížení, avšak tento vliv není dominantní. Jak ukazuje výkonová série směsi TVS a argonu v grafu na Obrázku 3, není zde pozorovatelný žádný prokazatelný trend, jedná se spíše pouze o nejistoty vzniklé měřením. Snímky v kapitole o mikroskopii atomárních sil získané právě pomocí této metody poukazují na prakticky nejen stejnou topografiu vrypů, ale i jejich průběh. U těchto vrstev plazmových polymerů se projevuje vliv zesítění už při nižším efektivním výkonu než u vrstev připravených z čistého TVS. Ke zvýšení zesítění dochází patrně vlivem bombardování rostoucí vrstvy urychlěnými ionty argonu při živé elektrodě; zvýšení zesítění materiálu má za důsledek vyšší hodnoty kritického normálového zatížení ve srovnání pp-TVS vrstvami. To také dokazuje hodnota modulu pružnosti pro pp-TVS/Ar vrstvu vůči hodnotám pro pp-TVS vrstvu u výkonu 2 W až 25 W; u vyšších měřených výkonů dochází k poklesu modulu pružnosti této směsi vůči TVS. Tento pokles pravděpodobně souvisí s póravitostí daného materiálu, která má zřejmě vyšší vliv na kritické normálové zatížení než samotné zesítění⁷. Sice u těchto vrstev (75 W a 150 W) obecně dochází k vyššímu zesítění, avšak vlivem póravitosti ve výsledku dochází naopak k mírnému poklesu hodnot kritického normálového zatížení vůči samotným vrstvám pp – TVS. Hodnoty jak kritického normálového zatížení, tak i modulu pružnosti u vzorku 150 W mohou být také ovlivněny vnitřním pnutím ve vrstvě.

U výkonové série deponované ze směsi tetravinylsilanu s kyslíkem můžeme pozorovat maximum při hodnotě 10 W, po dosažení této hodnoty spolu s rostoucím efektivním výkonem následně tato hodnota kritického normálového zatížení klesá, přesto dosahují vrstvy připravené z této směsi většinou nejvyšší hodnotu kritického normálového zatížení z pozorovaných plazmových polymerů. Skokový nárůst hodnoty kritického normálového zatížení koresponduje se skokovým nárůstem modulu pružnosti⁷. Vzorek deponovaný při 2 W dosahuje také stejně jako u 2 W pp – TVS/Ar vyšší hodnotu kritického normálového zatížení než čistý TVS z důvodu vyššího zesítění, vliv vyššího zesítění se projevuje u všech výkonů této série, vyšší zesítění má vliv jak na vyšší hodnoty mechanických vlastností, tak i adhezi. Vrstvy vzorků deponované při 10 W až 150 W jsou podobné strukturou jako SiO₂, tudíž dochází k lepší kompatibilitě a dobrému provázání pomocí vazeb mezi vrstvou a substrátem. U výkonů vyšších než 10 W lze předpokládat póravitost materiálu, kde při růstu vrstvy dochází k zapouzdření unikajícího oxidu uhličitého patrného v FTIR spektrech⁸. Výraznější pokles hodnoty kritického normálového zatížení u 150 W vzorku může být taktéž spojen s vyšším vnitřním pnutím.

Mezi další faktor, který může ovlivnit adhezi je stárnutí vrstev, jelikož u některých tenkých vrstev dochází s postupem času k jejich modifikaci v důsledku postdepozičních oxidací. Proto byly vzorky deponované z čistého TVS i obou směsí deponované při efektivních výkonech 2 W a 150 W podrobeny vrypové zkoušce. Tato měření byla studována po dobu 100 dnů, jako první den není brán den depozice, avšak až den následující po vyhasnutí radikálů. Získaná data byla zpracována a získané střední hodnoty spolu se směrodatnými odchylkami byly vyneseny do grafu, který je možné vidět na Obrázku 4.

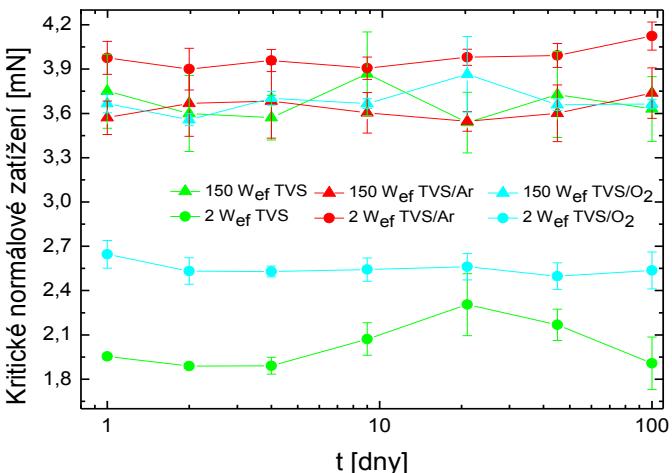


Obrázek 3: Graf závislosti kritického normálového zatížení jednotlivých typů vrstev na efektivním výkonu.

Z grafu časové závislosti kritického normálového zatížení na Obrázku 4 plyne, že během intervalu 100 dní, kdy probíhala měření a docházelo ke stárnutí vzorků za laboratorních podmínek v exsikátoru, nedochází k degradaci vzorků a změnám ve vrstvě, nebo přesněji na rozhraní vrstvy a substrátu, které by mělo významný vliv na hodnotu kritického normálového zatížení. Veškeré hodnoty kritického normálového zatížení jednotlivých vzorků oscilují kolem středních hodnot v rámci odchylky měření, hodnoty středních hodnot i směrodatných odchylek jsou v Tabulce 1. Pouze vzorek deponovaný při 2 W z čistého TVS projevuje jisté změny, avšak přesto tyto změny budou zřejmě způsobeny pouze vyššími nejistotami měření, jak tomu nasvědčuje i nárůst směrodatných odchylek.

Tabulka 1: Přehled středních hodnot kritického normálového zatížení a směrodatných odchylek vzorků plazmových polymerů měřených v časové závislosti.

Vrstva pp	Efektivní výkon [W]	Střední hodnota [μ N]	Směrodatná odchylka [μ N]
TVS	2	2 028	190
TVS	150	3 669	253
TVS/Ar	2	3 970	108
TVS/Ar	150	3 637	178
TVS/O ₂	2	2 549	95
TVS/O ₂	150	3 688	134



Obrázek 4: Graf závislosti kritického normálového zatížení na čase.

Provedené vrypy byly skenovány pomocí AFM za účelem získání topografických map. Na následujícím obrázku (Obrázek 5) jsou zobrazeny získané topografické mapy viditelných částí vrypu pro vzorky deponované při výkonu 150 W z čistého TVS i obou směsí. Na snímcích není viditelná počáteční fáze vrypu, protože po odlehčení hrotu dochází k obnovení zdeformované vrstvy díky elastickým vlastnostem těchto materiálů. V tomto důsledku je viditelná část vrypu mnohdy menší než nastavených 10 µm, celé snímky vrypu však mohou být větší v důsledku vyhrnutí velkého množství materiálu vrstvy na konci vrypu.

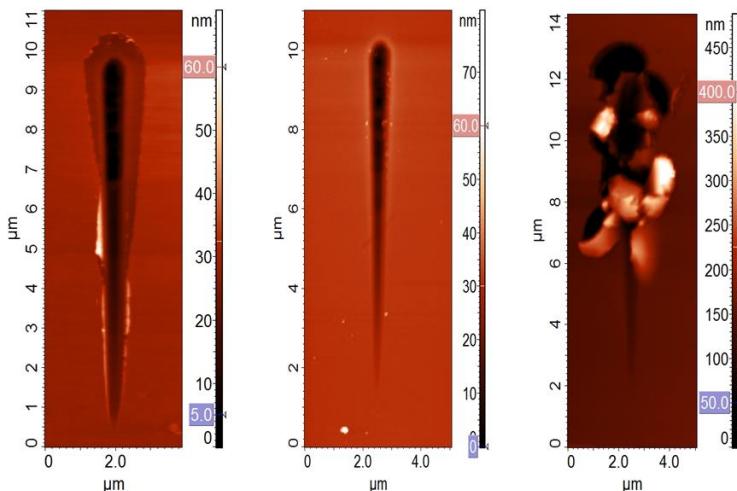
Vryp vzorku 150 W z čistého TVS (Obrázek 5 vlevo) je poměrně mělký, hloubka je přibližně 20 nm až 30 nm, to znamená, že došlo díky elastickým vlastnostem vrstvy k částečnému uzavření vrypu. Můžeme vidět, že nedochází k viditelnému odprýskávání vrstvy, avšak v okolí vrypu došlo k jistému promáčknutí vrstvy.

U snímku vrstvy pp – TVS/Ar (Obrázek 5 uprostřed) je patrné, že u vrypu nedochází k žádnému viditelnému odloupávání vrstvy ani vyhrnutí materiálu. Vryp má od místa selhání adheze až do konce provedení vrypu přibližně šířku vrypu od 0,6 µm do 0,7 µm a jeho hloubka se pohybuje v rozmezí od 20 nm do 30 nm. Můžeme si všimnout mírného vyhrnutí materiálu kolem tohoto vrypu v jednotkách nanometrů.

U snímku plazmového polymeru ze směsi TVS s kyslíkem (Obrázek 5 vpravo) je vidět, že dochází k poměrně vysoké míře porušení této vrstvy. Elastické vlastnosti této vrstvy jsou malé a nedochází zde k částečnému zavření vrypu a hloubka je stále kolem 100 nm a více. Dochází zde v nejvyšší míře k delaminaci polymerní vrstvy – odlamování, odlupování vrstvy i vyhrnování této vrstvy ve větším měřítku. Tento materiál je poměrně tvrdý, avšak křehký. V dráze vrypu za místem selhání adheze je vidět vyvýšenou část, což je nahromaděný materiál z vrypového kanálu. Tento materiál vykazuje sice poměrně vysokou hodnotu kritického normálového zatížení, kdy dojde k selhání adheze, avšak

z hlediska použití by zřejmě nebyl vhodný z důvodu vysoké destrukce materiálu, na rozdíl od 150 W vzorků pp – TVS a pp – TVS/Ar.

Z těchto snímků a z hodnot naměřených kritických normálových zatížení je patrné, že z vrstev vzorků z TVS a dvou směsí deponovaných při efektivním výkonu 150 W, kdy hodnoty kritické normálové síly jsou prakticky shodné, je vidět, že vryp polymerní vrstvy směsi TVS a argonu dosahuje dobrých vlastností na rozdíl od druhých dvou vzorků.



Obrázek 5: Ukázka AFM topografických snímků vrypu 150 W vzorků: vlevo pp-TVS vrstvy, uprostřed pp-TVS/Ar vrstvy a vpravo pp-TVS/O₂ vrstvy.

4 Závěry

Cílem práce bylo stanovení míry adheze vzorků pomocí vrypové zkoušky a posouzení reproducibilnosti výsledků s ohledem na čistotu substrátů, depoziční podmínky a stárnutí vrstev. Byly charakterizovány tenké vrstvy plazmových polymerů s přibližnou tloušťkou 100 nm, deponované při různých výkonech z monomeru tetravinylsilanu a jeho dvou směsí s argonem a kyslíkem na plošné křemíkové substráty metodou chemické depozice z plynné fáze. Byly získány topografické mapy vrypu pomocí mikroskopie atomárních sil za účelem posouzení nejen míry adheze vrstvy k substrátu, ale především ke zhodnocení charakteru porušení vrstev či jejich delaminace.

Bylo zjištěno, že reproducibilnost šesti simultánně deponovaných vzorků plazmových polymerů je dobrá, tudíž nezáleží, ze které pozice je vzorek použit pro analýzy. Dalšími měřenými bylo také dokázáno, že při samotném provedení vrypové zkoušky nezáleží na přesné pozici na vzorku a že vrstvy vykazují shodné hodnoty kritického normálového zatížení v rámci chyb po celé ploše vzorků, jsou tedy homogenní.

Při studiu vlivu dodávaného výkonu při předúpravě bylo zjištěno, že změna tohoto výkonu není významná a nemá prokazatelný vliv na hodnotu kritického normálového

zatížení, výsledky měření se liší pouze v rozsahu odchylky měření. Z toho plyně, že hodnota dodávaného výkonu 5 W je dostatečná.

Z výsledků měření vrypové zkoušky výkonových sérií vyplývá, že u vrstev pp – TVS deponovaných při výkonu 2 a 10 W jsou hodnoty kritického normálového zatížení přibližně dvakrát nižší než u vyšších výkonů, u těchto výkonů (25–150 W) dochází k nevýznamným změnám hodnoty kritického normálového zatížení pravděpodobně jen v rámci chyb měření. U vrstev pp – TVS/Ar nedochází k žádným výrazným změnám kritického normálového zatížení na měnícím se výkonu a tyto hodnoty oscilují kolem střední hodnoty. U směsi TVS s kyslíkem bylo dosaženo maximálního kritického zatížení při 10 W, u vyšších hodnot efektivních výkonů kritické normálové zatížení výrazně klesá v důsledku půrovnosti způsobené zapouzdřením plynů při tvorbě vrstvy. Z těchto tří sérií má nejvyšší hodnotu kritického normálového zatížení směs TVS/Ar ze všech vzorků deponovaných při 2 W. Nejvyšší hodnotu kritického normálového zatížení ze vzorků deponovaných při 20 až 75 W dosahuje směs TVS/O₂ i přes nižší hodnoty modulu pružnosti. Všechny tři vzorky deponované při 150 W dosahují stejné hodnoty kritického normálového zatížení v rámci chyb měření.

Během studia vlivu stárnutí vrstev po dobu sto dnů nedošlo k patrným změnám, tudíž lze říci, že nedochází k výrazným změnám na rozhraní vrstvy a substrátu, které by mohly ovlivnit hodnotu kritického normálového zatížení.

Z vrypů vzorků z TVS a dvou směsi deponovaných při efektivním výkonu 150 W, kdy hodnoty kritické normálové síly jsou prakticky shodné, je vidět, že vryp polymerní vrstvy směsi TVS a argonu dosahuje dobrých vlastností. Naopak vzorky ze směsi TVS a kyslíku vykazují poměrně vysokou míru porušení vrstev, dochází k rozrušení, praskání a odlupování vrstvy.

5 Literatura

1. ECKERTOVÁ, Ludmila. *Fyzika tenkých vrstev*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1973, 245 s.
2. OHRING, Milton. *Materials science of thin films: deposition and structure*. 2. vyd. San Diego: Academic Press, 2002, 794 s. ISBN 0-12-524975-6.
3. XU CHEN, BRADLEY L. KIRSCH, ROBERT SENTER, SARAH H. TOLBERT a VIJAY GUPTA. Tensile testing of thin films supported on compliant substrates. *Mechanics of Materials* [online]. 2009, 41(7): 839–848 [cit. 2015-11-07]. DOI: 10.1016/j.mechmat.2009.02.003.
4. INAGAKI, N. *Plasma surface modification and plasma polymerization*. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1996, 265 s. ISBN 15-667-6337-1.
5. COVAREL, G., B. BENSAID, X. BODDAERT, S. GILJEAN, P. BENABEN a P. LOUIS. Characterization of organic ultra-thin film adhesion on flexible substrate using scratch test technique. *Surface and Coatings Technology* [online]. 2012, vol. 211, s. 138–142 [cit. 2014-04-28]. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2011.09.057. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0257897211009443>
6. ARNES, Dunstan, Scott JOHNSON, Robert SNELL a Serena BEST. Using scratch testing to measure the adhesion strength of calcium phosphate coatings applied to poly(carbonate urethane) substrates. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* [online]. 2012, vol. 6, s. 128–138 [cit. 2014-04-28]. DOI:

10.1016/j.jmbbm.2011.10.010.

Dostupné

z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1751616111002888>

7. PLICHTA, T. *Adheze vrstev plazmových polymerů připravených z monomeru tetravinylsilanu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 64 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Vladimír Čech, Ph.D.
8. SADÍLEK, J. Brno: *Plasma-enhanced chemical vapor deposition using TVS/Ar and TVS/O₂ mixtures*. Brno university of technology, Faculty of chemistry. Institute of material research, 2013. 123 s. Master's thesis. Supervisor: Prof. RNDr. Vladimír Čech, PhD.

Práce byla podpořena projektem TA 01010796 – Využití plazmové nanotechnologie pro kompozity s vysokými užitnými vlastnostmi.

Vplyv mletia a zloženia východiskových zmesí na mikroštruktúru a mechanickú pevnosť penobetónov

Bc. Veronika Sepesiová, Ing. Eva Kuzielová, PhD.

Slovenská technická univerzita v Bratislave
Fakulta chemickej a potravinárskej technológie
Ústav anorganickej chémie, technológie a materiálov
Radlinského 9, 812 37 Bratislava 1, Slovenská republika
veronika.sepesiova@gmail.com

1 Úvod

Rozvoj stavebníctva prináša so sebou používanie neustále vylepšovaných stavebných materiálov, medzi ktoré patria aj penobetóny. Nízka objemová hmotnosť penobetónov, ktorá je dôsledkom ich poréznej štruktúry, vedie k podstatnej úspore vstupných materiálov [1]. Takáto štruktúra sa dosahuje použitím penotvorných činidiel (surfaktantov) počas prípravy penobetónu [2]. Kladnou stránkou týchto materiálov je aj ich jednoduchá aplikácia priamo na stavenisku a možnosť prípravy v širokom intervale objemových hmotností a požadovaných pevností. Pevnosť a poréznu štruktúru bežných betónov je možné pozitívne ovplyvniť mletím cementu, či jeho čiastočným nahradením vhodnými puzolánovými materiálmi. Jedným z nich je metakaolín, ktorý predstavuje často používanú náhradu cementu v tzv. zmesných cementoch. Okrem zvyšenia dlhodobých pevností a zjemnenia pôrovej štruktúry sa jeho použitím dosahuje zníženie energetických nárokov a spotreby vápencových materiálov [3]. Preukázanie vplyvu mletia a zloženia východiskových zmesí na dôležité charakteristiky penobetónov by umožnilo vývoj penobetónov disponujúcich nižšou objemovou hmotnosťou a súčasne dostatočnou mechanickou pevnosťou než sú v súčasnosti v stavebníctve používané materiály.

2 Experimentálna časť

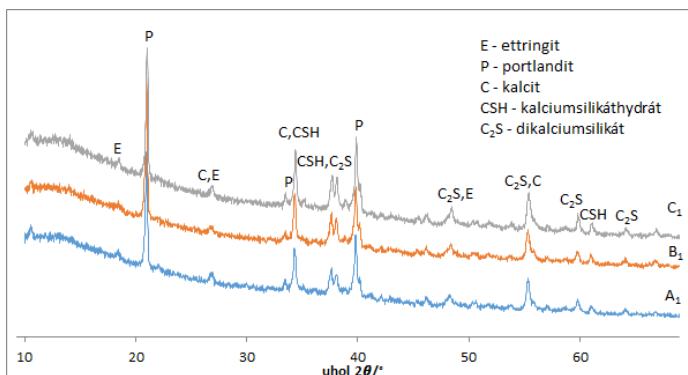
Všetky vzorky penobetónov boli pripravené z cementu (portlandský cement CEM I 42,5 R), vody a technickej peny (TP). TP bola pripravená penovým generátorom použitím proteínového penotvorného činidla FN1, ktorého koncentrácia bola znížená riedením vodou v pomere 1:3. FN1 sa pred prípravou TP upravovalo pôsobením ultrazvuku po dobu 6 min (25 kHz). Objemová hmotnosť TP dosahovala hodnotu približne 71 kg.m^{-3} . Hodnota vodného súčiniteľa – 0,475 v cementových kašíach bola udržiavaná konštantná.

Cement a voda sa spolu miešali až do získania homogénnej cementovej kaše bez hrudiek. Následne sa za kontinuálneho miešania pridávali do cementovej kaše 2 l TP. Po 5 min homogenizácií boli vzorky naliate do plastových nádob a ponechali sa tuhnúť a tvrdnúť na vzduchu pri laboratórnej teplote $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Hodnotilo sa fázové zloženie (RTG), objemová hmotnosť (OH) a mikroštruktúra vzoriek (REM, priemerná veľkosť pórov). Meranú pevnosť v tlaku boli vzorky penobetónov podrobene po 28 dňoch odo dňa prípravy. V prvej sérii experimentov bol sledovaný vplyv mletia cementu (0, 20, 60 min) na konečné vlastnosti penobetónov. Použité boli tri rávažky cementu (267, 280, 294 g). Druhá séria experimentov bola zameraná na štúdium vplyvu čiastočného nahradenia cementu metakaolínom (5, 10, 15 hm %) (L05, Mefisto, České lupkové závody).

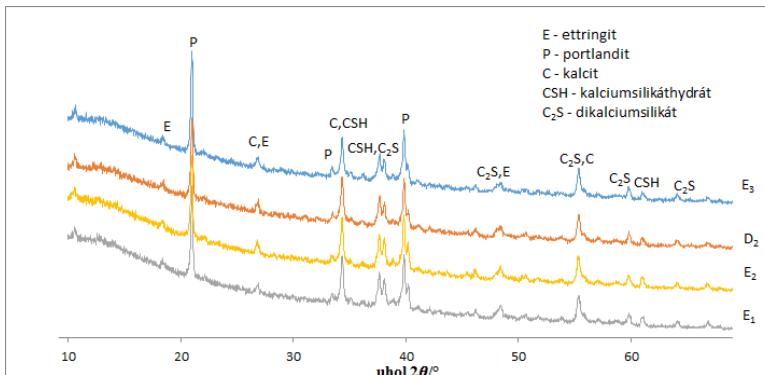
2.1 RTG analýza

RTG analýzou sa nepotrvdili rozdiely v zastúpení kryštalických fáz ani v jednej zo sérií vzoriek (obr. 1, 2). Hlavnou kryštalickou fázou bol v prípade všetkých vzoriek portlandit ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Ďalšími hydratačnými produktmi, ktoré boli RTG potvrdené, sú ettringit ($\text{Ca}_6\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3(\text{OH})_{12}\cdot 26\text{H}_2\text{O}$; $\text{C}_6\text{A}_2\text{S}_3\text{H}_{32}$) a kalciumsilikáthydrát ($\text{CaO} - \text{SiO}_2 - \text{H}_2\text{O}$; C-S-H). Ettringit vzniká v týchto systémoch ako produkt reakcií slinkových minerálov - trikalciumpotassium (CaO.Al₂O₃; C₃A) a tetrakalciumaluminátferitu (4CaO.Al₂O₃.Fe₂O₃; C₄AF) so síranom vápenatým (pridáva sa do portlandského slinku počas mletia vo forme sadrovca; regulátor tuhnutia). C-S-H je základným produkтом hydratácie portlandského cementu.

Urýchlenie hydratačných reakcií pri použití mletého cementu, ktoré by sa preukázalo nárastom intenzít difračných máxim náležiacich primárny či sekundárny kryštalickým produktom hydratácie cementu, bolo zistené až po 1 h mletí (obr. 1). Zmenou rýchlosťi hydratačných reakcií v sledovanom čase, ktorá by bola preukazateľná RTG analýzou, sa neprejavilo ani nahradenie portlandského cementu metakaolínom v rozsahu 5 hm % až 15 hm % (obr. 2).



Obrázok 1: RTG záznamy vzoriek pripravených z nemletého portlanského cementu (A1) a z cementu podrobenejmu mletiu po dobu 20 min (B1) a 60 min (C1).



Obrázok 2: RTG záznamy vzoriek pripravených čiastočným nahradením portlandského cementu metakaolínom v rozsahu 5 hm. % (E1), 10 hm. % (E2, D2) a 15 hm. % (E3).

2.2 Objemová hmotnosť

OH (počiatočná i konečná) sa v závislosti od mletia cementu ani množstva metakaolínu významne nemenila. So zvyšujúcim sa množstvom cementu sa OH vzoriek zvyšovala len nepatrne. Vzhľadom na malé zvýšenie množstva cementu (o 5 hm. %, resp. o 10 hm. %) sa veľké zvýšenie objemovej hmotnosti neočakávalo. Časť cementu mohla zostať v dôsledku nedostatočnej homogenizácie nalepená na stenách nádoby, v ktorej boli vzorky pripravované. Do istej miery môže byť táto skutočnosť prejavom destabilizačných mechanizmov, predovšetkým drenáže, pri ktorej môže gravitáciou odchádzajúca voda zo systému strhávať so sebou aj ľahšie cementové častice.

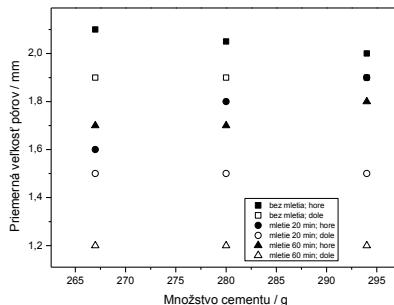
Konečná objemová hmotnosť všetkých vzoriek dosahovala hodnoty pod 200 kg m^{-3} .

2.3 Priemerná veľkosť častíc

Vplyv mletia portlandského cementu na priemernú veľkosť pór je znázornený na obr. 3. Kvôli lepšiemu ohodnoteniu stability penobetónov, a teda vplyvu destabilizačných mechanizmov v jednotlivých vzorkach, boli tieto rozdelené horizontálne na dve časti. Priemerná veľkosť pór bola stanovená z fotografií hornej i dolnej časti vzoriek.

Priemerná veľkosť pór vo vzorkoch pripravených z mletého cementu je vo všetkých prípadoch tak v hornej ako i v dolnej časti nižšia ako zodpovedajúca priemerná veľkosť pór vo vzorkoch z nemletého cementu. Mletie cementu teda viedlo k lepšej stabilizácii vzoriek voči destabilizačným mechanizmom pien. V dolnej časti všetkých vzoriek boli stanovené nižšie priemerné veľkosťi pór ako v ich horných častiach. Možno to vysvetliť rýchlejším stúpaním väčších bublín v mokrej pene smerom k voľnému povrchu vzoriek. U vzoriek, pre prípravu ktorých bol požitý mletý cement, sa s jeho zvyšujúcim sa množstvom zvyšoval aj rozdiel v priemernej veľkosti pór v hornej a dolnej časti. Keďže sa množstvo penotvorného činidla v experimentoch nemenilo, pozostávali tieto vzorky z väčšieho množstva menších (následkom mletia) cementových častíc, ktoré neboli všetky čiastočne hydrofobizované, a teda nemohli prispieť k stabilite bublín. Tieto neadsorbované častice boli v priebehu drenáže strhávané do spodnej časti

vzoriek a zvýšená nehomogénnosť systému bola spúšťačom destabilizačných mechanizmov.

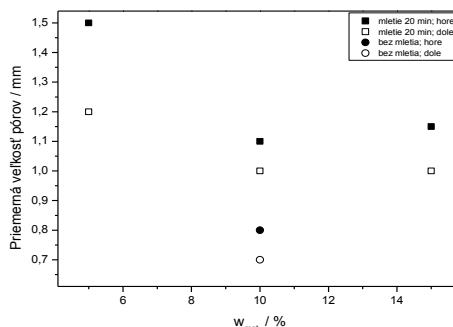


Obrázok 3: Závislosť priemernej veľkosti pôrov vzoriek od množstva nemletého a mletého cementu použitého na ich prípravu.

Závislosť priemernej veľkosti pôrov od množstva metakaolínu vo vzorkách z druhej série experimentov je zobrazená na obr. 4. Zvýšenie obsahu metakaolínu z 5 hm % na 10 hm %, resp. 15 hm % viedlo k zníženiu priemernej veľkosti pôrov. Všetky stanovené hodnoty sú nižšie ako je priemerná veľkosť pôrov vzoriek pripravených bez obsahu metakaolínu, a to bez ohľadu na to, či bol na ich prípravu použitý mletý alebo nemletý cement. Možno teda usudzovať, že nahradenie časti cementu metakaolínom viedlo k lepšej stabilizácii pien.

Najnižšiu priemernú veľkosť pôrov vykazuje vzorka s 10 hm % metakaolínu pripravená z nemletého portlanského cementu. K vyššej stabilité vzoriek z druhej série preto pravdepodobne vo vyššej miere prispeло použitie metakaolínu ako mletie cementu.

Priemerná veľkosť pôrov stanovená z dolných častí vzoriek je rovnako ako u vzoriek z prvej série experimentov nižšia ako zo zodpovedajúcich horných častí. Rozdiely medzi hodnotami však nie sú také výrazné ako v prípade vzoriek z prvej série, čo opäť potvrzuje väčšiu stabilitu vzoriek pripravených s metakaolínom.



Obrázok 4: Závislosť priemernej veľkosti pôrov vzoriek od množstva metakaolínu (v hm %) použitého na ich prípravu.

2.4 Pevnosť v tlaku

Už 20 min mletie cementu viedlo k zvýšeniu pevnosti v tlaku z pôvodných ~ 0,1 MPa na ~ 0,2 MPa. Predĺženie doby mletia na 1 h sa ďalším zvýšením hodnôt pevností v tlaku neprekázalo. Pevnosť v tlaku penobetónu pripraveného nahradením 10 hm % cementu metakaolínom bola v porovnaní so zodpovedajúcou vzorkou pripravenou bez metakaolínu (0,12 MPa) väčšia. Najvyššia pevnosť v tlaku bola nameraná pre vzorku pripravenú s najvyšším obsahom – 15 hm % metakaolínu (0,23 MPa).

3 Záver

Použitý spôsob prípravy a parametre (množstvo cementu, vodný súčinieľ, množstvo a objemová hmotnosť technickej peny) boli zvolené dobre a viedli k príprave stabilných penobetónov s požadovanou konečnou hodnotou objemovej hmotnosti pod 200 kg m⁻³. Mletie cementu ani čiastočná nahradá cementu metakaolínom nevedli k zmene fázového zloženia penobetónov, ktorá by bola preukázateľná RTG analýzou. Rovnako nebolo RTG zistené ani očakávané urýchlenie hydratačných reakcií pri použití mletého cementu, resp. metakaolínu. Dôvodom je inhibičný účinok penotvorného činidla. Mletie, ako aj nahradá časti cementu metakaolínom prispeli k zlepšeniu stability vzoriek, ktorá sa prejavila nižšími hodnotami priemernej veľkosti pórov a menšími rozdielmi medzi hodnotami v rôznych častiach vzoriek. Mletie cementu po dobu 20 min viedlo k zvýšeniu pevnosti v tlaku z ~ 0,1 MPa na ~ 0,2 MPa. Použitie metakaolínu malo za následok rovnaké zvýšenie pevnosti v tlaku, pričom najvyššia pevnosť (0,23 MPa) bola nameraná pre vzorku pripravenú s najvyšším zastúpením metakaolínu (15 hm %).

4 Literatúra

1. Foamed Concrete: Composition and Properties, British Cement Association, Ref. 46.042, 1994.
2. Li SJW: Discussion of foam agent related problems; 2011. [//www.lvchuangjz.com/jzzs/212.html](http://www.lvchuangjz.com/jzzs/212.html).
3. Roy D.M, Arjunan P, Silsbe M.R.: Effect of silica fume, metakaolin, and low-calcium flyash on chemical resistance of concrete, Cement Concrete Res. 31 (12) (2001), 1809–1813.

Poďakovanie:

Výskum bol financovaný z grantu VEGA 1/0696/15.

Príprava a využitie nanoželeza získaného z prírodných materiálov

Mária Solmošiová*

Lukáš Hrdlička

Jozef Prousek

Slovenská technická univerzita v Bratislave

Fakulta chemickej a potravinárskej technológie

Ústav chemického a environmentálneho inžinierstva

Radlinského 9 812 37 Bratislava Slovenská republika

*majka.solmosiova@gmail.com

1 Úvod

V posledných rokoch nanočastice či nanomateriály ako také vzbudili obrovský záujem ako odbornej verejnosti tak i bežných ľudí. Stretávame sa s nimi v bežnom živote. Nachádzajú sa v nekrčivých, či nepremokavých textíliach, využívajú sa v medicíne, pri povrchových úpravách materiálov, ale sú i dobrým pamäťovým médiom. Vďaka svojím výnimcočným vlastnostiam sa ich využitie rozšírilo i do vysoko špecifických procesov akými je aj úprava znečistených vôd či pôd.

Kontaminácia dnešných povrchových vôd je značná, a interval kontaminantov je natoľko široký, že aj dnes bežne používané postupy na degradáciu polutantov nie sú dostačujúce. Napríklad farbívá, ktoré sa bežne používajú v kozmetickom, farmaceutickom priemysle a v mnohých iných výrobach (hrubý odhad spotreby farbív ročne je $7 \cdot 10^5$ až $1 \cdot 10^6$ ton celosvetovo, z ktorých 60–70 % tvoria azofarbívá) predstavujú nebezpečenstvo pre životné prostredie, nakoľko 10–20 % farbív obsiahnutých v odpadových vodách vstupuje do životného prostredia kde môže pôsobiť toxicky na biocenózu [1].

Na degradáciu polutantov prítomných v odpadových vodách sú v praxi často používané metódy založené na produkcií hydroxylového radikálu, ktorý patrí medzi najsilnejšie oxidačné činidlá a vykazuje malú selektivitu, vďaka čomu môže oxidovať široké spektrum zlúčenín a môžeme ich pomenovať ako pokročilé oxidačné metódy (Advanced Oxidation Processes, AOPs) [2]. Tieto metódy majú v praxi mnoho modifikácií, v ktorých sa uplatňujú aj samotné nanočastice. V jednej z najnovších metód je uplatnené nanoželezo – nZVI (nanoscale zero-valent iron), ktoré je v súčasnosti študované pre sanáciu životného prostredia. Prvé výsledky potvrdili predpoklady širokého uplatnenia. nZVI bolo použité aj v špecifických prípadoch kedy boli polutantmi vôd herbicídy, výbušniny či sa upravovalo nukleárny odpad [3].

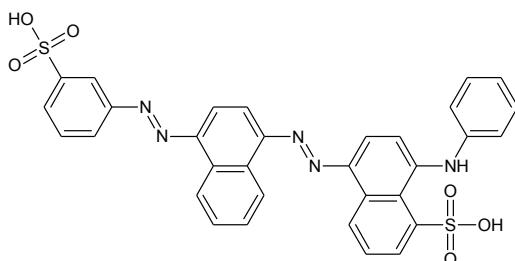
V tejto práci bolo použité špeciálne pripravené nanoželezo a to za pomocí extraktov z listia. V porovnaní s inými metódami (najčastejšia komerčná príprava nZVI, použitím

zlúčeniny borohydridu sodného NaBH_4) [4] príprava tohto nanokompozitu našim spôsobom má mnoho výhod. Nie je toxická, je finančne nenáročná a v prvom rade využíva prírodné materiály, ktoré sú považované za odpad a je teda ekologická. Touto zelenou metódou, ktorá používa lístie na prípravu nanoželeza (nZVI) a jeho následným použitím na degradáciu modelovej odpadovej vody pripravenej z azofarbiva – Acid Blue 113 sa zaoberá predkladaná práca.

2 Experimentálna časť

2.1 Polutanty vód

Ako už bolo spomenuté, v dnešnej dobe polutanty vód predstavujú široké spektrum látok. V skúmanej modelovej vzorke, bolo ako zástupca polutantu použité farbivo Acid Blue 113 alebo Midlonová Modř 5R, čo je často používaný názov použitého farbiva, sa najčastejšie používa v priemysle na farbenie vlny, nakoľko sa vďaka nej dosahuje hlboký odtieň [6].



Obrázok 1 – Štruktúrny vzorec farbiva Acid Blue 113

Ako môžeme vidieť na Obr. 1 v jeho štruktúrnom vzorci je 6 aromatických cyklov, ktoré sú príčinou toxicity a súčasne aj perzistencia uvedeného farbiva. Toto farbivo je taktiež považované za karcinogénnu látku. Rozpustenie týchto farebných zlúčenín vo vode zvyšuje biochemickú spotrebú kyslíka, a tým znižuje prienik svetla do vody [6]. Vzhľadom na vysoký stupeň prítomnosti aromatických skupín v štruktúre farbiva je táto látka stabilná, a tak konvenčné fyzikálnochemické či biochemické metódy úpravy odpadových vód sú neefektívne pri jej odstraňovaní [7].

Tabuľka 1 – Charakteristiky farbiva Acid Blue 113

Sumárny vzorec	CAS číslo	Mólová hmotnosť [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]
$\text{C}_{32}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2$	[3351-05-1]	637,685
Hustota [$\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$]	Absorbancia [nm]	Zastúpenie jednotlivých prvkov
$1,46 \pm 0,1$	574	C (60,27 %), H (3,64 %), N (10,98 %), O (15,05 %), S (10,06 %).

2.1.2 Príprava modelovej vzorky

Základný roztok degradovaného farbiva - Acid Blue 113 bol pripravený do 2 litrovej odmernej banky s koncentráciou $c = 100 \text{ mg l}^{-1}$ a bol skladovaný pri laboratórnych podmienkach. Pre výpočet účinnosti degradácie bola nameraná kalibračná krivka tohto azofarbiva nasledovným postupom: Zo základného roztoku farbiva s $c = 100 \text{ mg l}^{-1}$ bolo do odmerných kadičiek pripravených 10 roztokov s rozdielou koncentráciou, ktorým bola trikrát zmeraná absorbancia pri rovnakej vlnovej dĺžke 574 nm.

2.2 Nanoželezo nZVI

Začiatky používania nanoželeza sa viažu k roku 1990, kedy sa začalo používať v prieplustných reaktívnych bariérach (PRBs) na úpravu vôd (odpadových, podzemných), ale i pôd a sedimentov. Najčastejšimi látkami spôsobujúcimi znečistenie v týchto systémoch sú chlórované kontaminanty, alebo fažké kovy (chróm, olovo) a samozrejme chlórované pesticídy (Lindán, DDT) [7]. Nanoželezo sa v poslednej dobe stále viac uplatňuje v oblastiach environmentálneho inžinierstva. Tento materiál sa javí ako sľubné činidlo pri sanácii znečistených vôd vďaka jeho špeciálnym vlastnostiam.

- Rozmery používaneho nanoželeza sa pohybujú v intervale od 1 až po 100 nm. (Pre porovnanie typická bakteriálna bunka má priemer rádovo $1 \mu\text{m}$ čo predstavuje 1000 nm) [4].
- Povrch nanočastic železa je veľký vzhľadom k ich jednotkovej hmotnosti a tak sú tieto čästice veľmi účinné redukčné činidlá [1].
- Nanočasticie železa môžu byť efektívne transportované tokom podzemnej vody, viac ako 20 m, kde môžu byť vstrekované pod tlakom alebo len dôsledkom gravitácie. nZVI môžu ostávať reaktívne voči kontaminantom v pôde a podzemných vodách po dlhšiu dobu (>4–8 týždňov) [4].
- Toxický vplyv sa ukázal napríklad na kultúre baktérií *Escherichia coli*. Fytoplankton zooplankton vyzkazoval po vystavení nZVI nižší populačný rast.
- Železnaté ióny sú schopné vstupovať do buniek a vytvárať oxidačný stres, ktorý v konečnom dôsledku spôsobuje bunkovú smrť apoptózou [8].

2.2.1 Príprava nZVI a degradácia azofarbiva Acid Blue 113 nanoželezom

nZVI bolo pripravené z výluhu z listov magnólie nasledovným postupom: Do Erlenmeyerovej banky bolo pridaných 2,5 g lístia, ktoré bolo pozbierané zelené a následne voľne vysušené, a nameraných 500 ml vody. Táto zmes sa 2 hodiny varila pri teplote 80°C za stáleho miešania na magnetickom miešadle. Po ochladení bol roztok prefiltrovaný, následne sa rozdelil do kadičiek po 50 ml, do ktorých sa navážilo 0,139 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Vo všetkých kadičkách bola následne upravená hodnota pH na 7–8 pomocou 5%-ného roztoku NaOH. Po odstáti boli roztoky viac krát dekantované a následne sa usadenina, obsahujúca komplexy nanoželeza, odstredila v odstredivke Biosan LMC 3000 (1800 rpm, 6 min.). Po odstredení výfažok obsahoval 12 ml kašovitého nZVI.

Do 500 ml Erlenmeyerovej banky, ktorá bola obalená v alobale, kvôli zabráneniu prístupu svetla, bolo pridaných 300 ml základného roztoku farbiva Acid Blue 113,

ktorého pH bolo upravené za stáleho miešania (250 rpm) 5%-ným roztokom H_2SO_4 na hodnotu 3–4. Následne sa do 4 baniek s roztokom farbiva odpipetovalo 0,5; 1,5; 2,5 alebo 3,5 ml kašovitého extraktu komplexu nanoželeza a v 0., 1. a 2. hodine bolo pridaných 0,1 ml peroxidu vodíka H_2O_2 (30 %). Reakcia bežala za stáleho miešania 3 hodiny, pričom v 1., 2. a 3. hodine bolo odobraných 10 ml vzorky. V odobranej vzorke bolo vyzrážané železo a po filtrace sa zmerala absorbancia. Po ukončení reakcie sa roztok v Erlenmeyerovej banke celý vyzrážal ($\text{pH} = 7$), prefiltroval a použil na stanovenie CHSK_{Cr} a respirometrické testy. Tieto roztoky obsahujúce nanoželezo a farbivo boli podrobené aj testom toxicity podľa metódy opísanej v OECD.

2.3 Fentonova reakcia

Fentonova reakcia železnatých iónov s peroxidom vodíka s optimálnou hodnotou $\text{pH} = 3$ až 4 generuje HO^\bullet radikály, ktoré patria k najsilnejším oxidačným činidlám. Vykazujú malú selektivitu a sú schopné oxidovať široké spektrum zlúčenín [2].



Vďaka svojim výhodám akými sú nenáročné technologické zariadenia na jej realizáciu, vysoká účinnosť a v neposlednom rade i nízke náklady si nachádza široké uplatnenie v praxi hlavne pri úprave vody pred jej čistením v biologických čistiarňach odpadovej vody. V súčasnosti sa využívajú rôzne modifikácie FR na zvýšenie jej účinnosti a samozrejme zníženie nákladov. Tieto reakcie, ktoré bežia na princípe FR sa nazývajú „Fenton-like reaction“ – FLR.

2.3.1 Degradácia Acid Blue 113 Fentonovou reakciou

Do 500 ml Erlenmeyerovej banky bolo nameraných 300 ml základného roztoku farbiva a upravené pH na hodnotu 3–4 kyselinou sírovou. Potom bolo navážených a do banky pridaných 0,1 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1 ml 30% peroxidu vodíka.

Celý roztok sa miešal magnetickým miešadlom a po 1 hodine bolo odobratých 10 ml vzorky, 5%-ným roztokom NaOH vyzrážaný hydroxid železitý a po jeho odfiltrovaní bola spektrofotometricky odmeraná výsledná absorbancia. K zvyšnému roztoku v Erlenmeyerovej banke bol pridaný taký istý návažok heptahydriátu síranu železnatého a taktiež rovnaký objem peroxidu. Celý tento proces sa opakoval trikrát a po odobratí 3. vzorky (a jej spracovaní a spektrofotometrickom odmeraní) bol vyzrážaný celý objem a po odfiltrovaní v čírej kvapaline potom stanovené hodnoty výslednej CHSK_{Cr}. Tento roztok sa použil aj na respirometrické testy a testy toxicity.

2.4 Kovové železo

Pre efektívnejšie degradovanie organických chlórovaných polutantov, ako sú trichlóretán, perchlóretýlén, DDT či azo farbivá, sa využívajú redukčné vlastnosti kovového železa Fe^0 . Vďaka jeho rozšírenosti nie je jeho použitie finančne náročné, avšak vyžaduje si predúpravu, z dôvodu jeho ľahkej oxidácií na vzduchu. Najúčinnejším látkou na aktiváciu železa, zbavenie sa produktov oxidácie, sa ukázala kyselina sírová (H_2SO_4) [9].

2.4.1 Degradácia Acid Blue 113 kovovým železo (Fenton Like Reaction)

Tento spôsob degradácie sa radí k modifikáciám klasickej Fentonovej reakcie (FLR), kde ako zdroj železnatých katiónov bola použitá železná stružlina, a to nasledovným spôsobom.

Stružlina bola ponorená na 5 min do 20%-nej kyseliny sírovej, z dôvodu aktivácie jej povrchu. Následne bola opláchnutá destilovanou vodou, usušená handričkou a odvážená jej hmotnosť $m_{iz} = 20,537$ g. Po odvážení bola opláchnutá destilovanou vodou a vložená do Erlenmeyerovej banky nastoknutá na sklenej „hokejke“, ktorá bola obalená alabalom a kde už bolo pripravených 300 ml farbiva a 0,05 ml koncentrovanej H_2SO_4 . Po indukčnej dobe sa pridalo 0,4 ml H_2O_2 .

V nasledujúcich troch hodinách bolo trikrát odobraných 10 ml vzorky, ktorá sa po úprave pH a prefiltrovaní použila na premeranie absorbancie a do zvyšného roztoku v banke bolo ešte dvakrát pridaných 0,4 ml peroxidu vodíka.

Po ukončení reakcie bol roztok v Erlenmeyerovej banke vyzrážaný, prefiltrovaný a použitý na stanovenie CHSK_{Cr}, respirometrické testy a testy toxicity. Nakoniec bola znova stanovená hmotnosť železnej stružliny, ktorá sa znížila na hodnotu $m_{ik} = 20,346$ g.

3 Výsledky práce

Príprava nanočastic železa z lístia bola možná len vďaka redukčným vlastnostiam polyfenolov obsiahnutých v prírodných materiáloch. Tieto zlúčeniny majú silné antioxidačné schopnosti, vďaka ktorým redukujú Fe^{2+} ióny, ktoré boli pridávané do reakcie v podobe heptahydruátu síranu železnatého za vzniku nZVI [7].

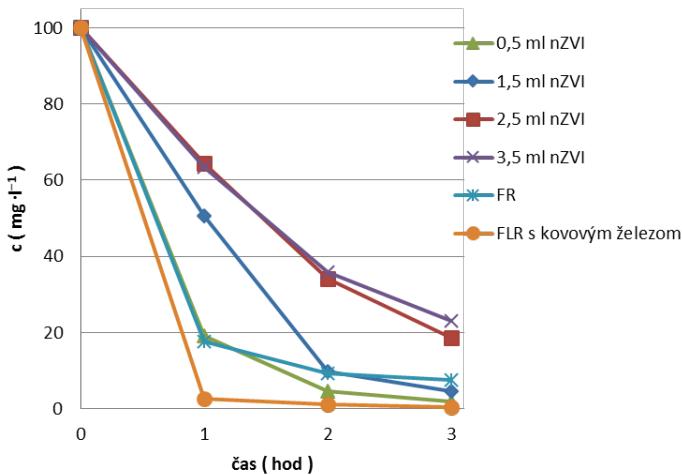
Zmeny koncentrácie farbiva v stanovených reakčných zmesiach boli určované na základe výpočtu z rovnice trendovej čiary vopred pripravenej kalibračnej krivky roztokov Acid Blue 113 s rôznou koncentráciou ($y=54,519*x+0,2997$).

Meranie účinnosti nZVI bolo porovnávané aj s klasickou a modifikovanou FR a sumárne výsledky týchto meraní sú uvedené v Tabuľke 2.

Tabuľka 2: Sumárne výsledky poklesu farebnosti (%) po degradácii FR, FLR s kovovým železom a nZVI vzhľadom k reakčnému času (hod)

Pokles farebnosti za čas [h]	FR	FLR	0,5 ml nZVI	1,5 ml nZVI	2,5 ml nZVI	3,5 ml nZVI
1	82,25	97,25	80,78	49,44	35,59	36,46
2	90,59	98,94	95,47	90,27	65,90	64,21
3	92,45	99,54	98,01	95,45	81,27	77,02

Avšak okrem iného, na účinnosť degradácie farbiva vplávala aj hodnota pH, čo môžeme pozorovať na obrázku 2.



Obr. 2 – Zmena koncentrácie ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) farbiva Acid Blue 113 vzhľadom na použitý objem nZVI či metódu degradácie a čas (hod)

Ako nám ukazuje Obr. 2 k najväčšiemu úbytku farbiva došlo počas prvej a druhej hodiny, kedy bola hodnota pH v banke najnižšia (postupne bol pridávaný peroxid). Hlavným dôvodom, prečo bol proces odfarbovania riadený kyslosťou prostredia, by mohla byť silná redukčná reakcia vplyvom nanoželeza, čo má za následok redukčné štiepenie azo skupiny farbiva [10]. Porovnávaná bola účinnosť jednotlivých Fentonových systémov na odfarbenie. V tomto prípade sa najlepšie výsledky dosiahli pri použití FLR reakcie s kovovým železom, kde bolo dosiahnuté najrýchlejšie a najlepšie odfarbenie ako môžeme vidieť v grafe (Obr. 2).

Tabuľka 3: Sumárne výsledky zmeny hodnôt CHSK_{Cr} , respirometrických testov a testov toxicity po degradácii FR, FLR s kovovým železom a nZVI

Experiment	Respirometrické testy (%)	$\text{CHSK}_{\text{Cr}} (\text{mg} \cdot \text{l}^{-1})$	Inhibícia (%)	Smerodajná odchýlka (cm)
štandard	-3,2	97	-	-
FR	79,84	56	75,93	0,070
FLR	38,92	39	61,82	0,160
0,5 ml nZVI	17,39	224	73,57	0,098
1,5 ml nZVI	51,99	132	63,56	0,165
2,5 ml nZVI	18,64	143	69,29	0,158
3,5 ml nZVI	81,09	155	63,91	0,151

Z Tab. 3 vyplýva, že sa zlepšila chemická oxidovateľnosť pôvodného roztoku s azofarbivom, ktorý je iba slabo oxidovateľný v prostredí CHSK_{Cr} ($97 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) po pridaní nZVI do reakcie na rozdiel od klasickej FR a modifikovanej reakcie so železnou stružinou, kedy sa hodnota CHSK_{Cr} znížila. Po použití jednotlivých FLR systémov s nZVI došlo

k rozpadu skeletu základnej molekuly farbiva, k oxidácii vzniknutých reakčných medziproduktov, a teda k lepšej oxidovateľnosti.

Vykonané respirometrické potvrdili, že azo farbivo Acid Blue 113 je toxické pre biologické systémy. Po aplikácii FLR s 3,5 ml nZVI bola najviac stimulovaná respiračná rýchlosť aktivovaného kalu, ale všetky výsledné roztoky sú vhodné pre ďalšie biologické dočistenie.

Testy toxicity podľa OECD Guidelines 208 ukazujú, že výsledné reakčné roztoky majú u porovnaní s pitnou vodou inhibičný vplyv na rast semien *Sinapis Alba*. Predpokladá sa však, že pôvodné azofarbivo sa správa toxickejšie ako uvedené roztoky predčistené pomocou FLR. Z tohto dôvodu bude v budúcnosti potrebné vykonať aj testy toxicity s pôvodným roztokom azofarbiva. Z výsledkov je vidieť že FLR systémy majú menší inhibičný efekt ako samotná FR.

4 Záver

Cieľom tejto práce, bolo overenie možnosti výroby nanoželeza z prírodných odpadových materiálov, ako je lístie, ktoré nemá žiadnu ďalšiu pridanú hodnotu. V predloženej práci boli na syntézu nZVI úspešne použité extrakty z lístia magnólie. Následne bolo skúmané použitie získaného nZVI resp. jeho komplexu na degradáciu azofarbiva Acid Blue 113 pomocou Fentonovej reakcie a jej modifikácií. Štúdiom pripravených roztokov farbiva s rôznymi objemami nZVI sme dospeli k záveru, že najlepšia účinnosť degradácie a odfarbenia bola dosiahnutá najmenším použitým objemom prírodného extraktu.

5 Literatúra

1. HE, Y. – GAO, J. F. – FENG, F. Q. – LIU, CH. – PENG, Y. Z. – WANG, S. Y. 2012. The comparative study on the rapid decolorization of azo, anthraquinone and triphenylmethane dyes by zero-valent iron. In Electronic Chemical Engineerind Journal[online].2012, vol 179, p. 8-18. Dostupné na internete: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894711006887>>.
2. PROUSEK, J. 1996. Advanced Oxidation Processes for Water Treatment. Chemical processes. Chemické listy, vol 90, p. 229-237.
3. CHEKLI, L. – BAYATSARMADI, B. – SEKINE, R. – SARKAR, B. - SHEN, A.M. – SHECKEL, K. G. – SKINNER, W. – NAIDU, R. – SHON, H. K. - LOMBI, E. – DONNER, E. 2015. Analytical characterisation of nanoscalezero-valent iron: An illustrated methodological review. In Electronic Analytica Chimica Acta[online]. 2015, doi: 10.1016/j.aca.2015.10.040.) In Press. Dostupné na internete: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267015013197>>.
4. RIBEIRO, A. R. – NUNES, O. C. – PEREIRA, M. F. R. – SILVA, A. M. T. 2015. An overview on the advanced oxidation processes applied for the treatment of water pollutants defined in the recently launched Directive 2013/39/EU. In Electronic Environment International [online]. 2015, vol. 75, p. 33 – 51. Dostupné na internete: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412014003213>>.

5. SARAVANAN, M. – PABMANAVHAN. N. – SIVARAJAN. S. M. 2010. Treatment od Acid Blue 113 Dye Solution Using Iron Electrocoagulation.In Electronic CLEAN – Soil, Air, Water [online]. 2010. vol. 38, p. 565-571. Dostupné na internete: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/clen.200900278/abstract>>.
6. SHIZARD-SIBONI, M. – JAFARI. S. J. – GIAHI. O. – KIM. I. – LEE. S. M. – YANG. J. K. 2014. Removal of acid blue 113 and reactive black 5 dye from aqueous solutions by activated red mud.In Electronic Journal of Industrial and Engineering Chemistry [online]. 2014. vol. 20. p. 1432-1437.Dostupné na internete: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1226086X13003390>>.
7. GUPTA, V. K. – GUPTA. B. – RASTOGI. A. – AGARWAL. S. – NAYAK. A. 2011. A comparative investigation on adsorption performances of mesoporous activated carbon prepared from waste rubber tire and activated carbon for ahazardous azo dye—Acid Blue 113. In Electronic Hazardous Materials [online]. 2011, vol 186, p. 891-901. Dostupné na internete: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389410015177>>.
8. MACHADO, S. – PINTO. S. L. – GROSSO. J. P. – NOUWS. H. P. A. ALBERGARIA. J. T. – DELERUE-MATOS. C. 2013. Green production of zero-valent iron nanoparticles using tree leaf extracts. In Electronic Science of the Total Environment [online]. 2013, vol 445 – 446, p. 1-8. Dostupné na internete: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969712015835>>.
9. BAUTITZ, I. R. – VELOSA. A. C. – NOGUEIRA. R. F. P. 2012. Zero valent iron mediated degradation of the pharmaceutical diazepam. In Electronic Chemosphere [online]. 2012, vol. 88, p. 688 – 692. Dostupné na internete: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653512004456>>
10. CHANG, S. H., WANG, CHAO, S. J., PENG, T. H., HUANG, L. C.: Degradation of azo and anthraquinone dyes by a low-cost Fe-0/air Process. In Eletronic Journal of Hazardous . Materials [online]. 2009, vol 166, s. 1127-1133 . Dostupné na internete: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19147287>>

Podčakovanie: Moje vrúcne podčkovanie patrí najmä doc. Ing. Jozefovi Prouskovi, CSc. za pomoc a odborné rady pri písaní bakalárskej práce a taktiež za nesmiernu motiváciu. Za nekonečnú trpezlivosť a usmernenia v laboratóriu pri meraní by som chcela podčakovať Ing. Lukášovi Hrdličkovi.

Táto práca bola podporená grantom STU v Bratislave s názvom „Program pre podporu mladých výskumníkov“ z roku 2015 č. 1375.

Suspenze oxidu titaničitého pro materiálový tisk

Bc. Tomáš Svoboda
Ing. Petr Dzik, Ph.D.

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická
Ústav fyzikální a spotřební chemie
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Česká republika
svoboda.tomino@gmail.com

1 Úvod

Znečišťování životního prostředí je v dnešní době vážným problémem. Jednou z možností zlepšení našeho životního prostředí je využití fotokatalytických reakcí. Při fotokatalýze je využíváno záření fotokatalyzátory, které jsou díky tomu schopny rozkládat různé nečistoty, organické látky nebo bakterie a plísň.

Z hlediska netoxičnosti, vysoké fotokatalytické účinnosti a v neposlední řadě také dostupnosti (z finančního hlediska) je oxid titaničitý velice lákavá možnost pro potenciální využití jako fotokatalyzátor. Dnes se výzkum zaměřuje na imobilizaci oxidu titaničitého ve formě tenkých filmů na substrát. Jednou z možností nanášení je materiálový tisk, pro který je třeba připravit inkousty, které musí mít vhodné vlastnosti pro danou materiálovou tiskárnu. Důležitým parametrem je stabilita nanočástic oxidu titaničitého v inkoustu a jejich velikost.

2 Experimentální část

2.1 Příprava vzorků suspenzí

Bylo připraveno 60 vzorků suspenzí oxidu titaničitého. Na přípravu byly použity dva zdroje TiO₂. Jeden jako vodná disperze Tiodispers NA-AS s obsahem 35 % TiO₂ a druhý v práškové formě od firmy Sigma Aldrich s udávanou velikostí částic kolem 21 nm (označovaný jako Aeroxid). Složení některých suspenzí je zaznamenáno viz Tabulka 1. Byla připravena disperzní prostředí a do nich byl vnášen oxid titaničitý v příslušné formě vždy o hmotnosti 1 g a to i v případě, že se jednalo o vodnou disperzi, která obsahovala pouze 35 % TiO₂. K dispergaci bylo nejdříve využito míchání pomocí skleněné tyčinky a následně pomocí ultrazvuku.

Chemikálie použité při přípravě disperzních prostředí

- organická rozpouštědla: cyklohexan a toluen
- alkoholy: methanol, ethanol, butanol, i-butanol, hexanol, propanol
- organické kyseliny: citronová, octová, nonanová, palmitová
- povrchově aktivní látky: abeson, AOT, triton X-102
- anorganická kyselina: kyselina chlorovodíková
- destilovaná voda

Vyhodnocování stability suspenzí bylo provedeno po přípravě všech suspenzí, které byly opět promíchány a vloženy do ultrazvuku. Následně byly ponechány v klidu tři dny a po této době byla provedena jejich dokumentace a vyhodnocení stability.

Dokumentace byla ve formě fotografování vzorků a sledování pozorování usazenin. Byl využit digitální fotoaparát Nikon D50.

Ze všech vzorků bylo vybráno 10 nejstabilnějších (označení žlutou barvou) pro další experimenty.

Tabulka 1: složení suspenzí a dokumentace stability

A3	tiodispers (g)	pH (HCl)	voda (ml)
A3a	1,12	0,99	10
A3b	0,99	2,11	10
A3c	1,10	3	10
A3d	1,03	4	10
A3e	1,11	5	10



Obrázek 1: vlevo A3a, vpravo A3e

A5	tiodispers (g)	pH (HCl)	AOT (g)	voda (ml)
A5a	0,9978	0,99	1,01	10
A5b	1,0646	2,11	1,05	10
A5c	1,1616	3	1,01	10
A5d	1,0678	4	1,07	10



Obrázek 2: vlevo A5a, vpravo A5d

A6	Tiodispers (g)	pH (HCl)	Abeson (g)	voda (ml)
A6a	1,07	1,02	0,8027	10
A6b	1,08	1,02	0,4035	10
A6c	1,08	1,02	0,2166	10
A6d	1,02	1,02	0,1195	10



Obrázek 3: vlevo A6a, vpravo A6d

B2	alkohol	tiodispers (g)	k. nonanová (ml)	alkohol (ml)
B2a	ethanol	1,10	1,1	10,14
B2b	butanol	1,01	1,1	9,88
B2c	hexanol	1,10	1,1	9,62
B2d	methanol	1,02	1,1	10,1



Obrázek 1: vlevo B2a, vpravo B2d

C3	alkohol	aeroxid (g)	k. palmitová (g)	alkohol (ml)	
C3a	ethanol	1,04	1,05	10,14	
C3b	i-butanol	1,06	1,02	9,9	
C3c	hexanol	1,07	1,05	9,62	



Obrázek 5: vlevo C3a, vpravo C3c

D1	roz-pouštědlo	aeroxid (g)	triton X-102 (g)	roz-pouštědlo (ml)	
D1a	Toluен	1,00	1,00	9,23	
D1b	Cyklohexan	1,12	1,03	10,3	



Obrázek 6: vlevo D1a, vpravo D1b

D4	roz-pouštědlo	aeroxid (g)	k. nonanová (ml)	roz-pouštědlo (ml)	
D4a	toluen	1,10	1,1	9,23	
D4b	cyklohexan	1,09	1,1	10,3	



Obrázek 7: vlevo D4a, vpravo D4b

2.2 DLS

Byly proměněny vzorky A6a, C3c, A3e, A3c, B2a, D4b, D4a, A3d, A5b, D1a. Bylo použito zařízení ZetasizerNano ZS. Zdroj záření byl laser o vlnové délce 633 nm. Měření probíhalo při 25 °C. Jen vzorky A6a, A3e, A3c, B2a, A3d, A5b bylo možné změřit, protože vzorky s organickými rozpouštědly ulpívaly na stěnách křemenné kyvety a vytvářely neprostupný film. Výsledky vzorků A5b, A6a a B2a byly přepočítány pomocí viskozit jeich disperzního prostředí. U ostatních vzorků byla použita viskozita vody při 25 °C.

2.3 Analytická odstředivka (LUMiSizer)

Bylo proměřeno 10 vzorků, které byly vybrány jako ty nejstabilnější A6a, C3c, A3e, A3c, B2a, D4b, D4a, A3d, A5b, D1a. Pro zaplnění všech pozic v odstředivce byly dva vzorky zdvojeny A6a2, A5b2. Bylo využito zařízení LUMiSizer. Byl proveden test stability, který probíhal za podmínek 25 °C, 3000 otáček za minutu. Vlnová délka záření procházejícího kyvetami byla 865 nm. Měření probíhalo 125 minut. LUMiSizer zaznamenával transmitanci záření procházejícího vzorkem.

2.4 Tisk vrstev oxidu titaničitého

Tisk proběhl na tiskárně Dimatix (DMP-2800). Po zhodnocení stability a vhodnosti pro tisk, byl zvolen vzorek A6a pro další experimenty. Tento vzorek byl filtrován a zbaven tak hrubé frakce. První sada vzorků A6a byla natištěna při teplotě 60 °C a s úhlem vytočení tisková hlavy 21°. Substrát byla mikroskopická podložní sklíčka bez úpravy jen očištěná. Bylo natištěno pět vzorků s počtem tištěných vrstev od jedné do pěti. Vyšší teplota byla zvolena s ohledem na fakt, že inkoust špatně smáčel podkladové sklíčko a bylo nutné co nejrychleji odpařit rozpouštědlo, aby se předešlo stahování částic oxidu titaničitého do středu kapky. Plošná velikost byla 1×1 cm. Tyto vzorky byly použity pro stanovení fotokatalytické aktivity a tvrdosti vrstev. Dále byly vzorky sledovány pod mikroskopem. Všechny vzorky byly vypáleny v peci při teplotě 500 °C po dobu jedné hodiny.

Druhá sada byla tištěna obdobně jen s tím rozdílem, že úhel vytočení tiskové hlavy byl 6,8°. Bylo natištěno deset vzorků na sklíčka pokrytá FTO. Vždy dvojice s různou tepelnou úpravou. Každá dvojice měla jiný počet vrstev od jedné do pěti. Tyto vzorky byly zkoumány pomocí SEM. Jedna sada byla upravena při 100 °C, kdy bylo odstraněno pouze rozpouštědlo, a druhá sada byla žíhána při 500 °C.

2.5 Optická mikroskopie

Natištěné vrstvy oxidu titaničitého (od jedné do pěti vrstev) byly charakterizovány optickým mikroskopem. Z důvodů netransparentnosti vrstev bylo zvoleno nasvícení z vrchu halogenovou žárovkou. Zvětšení bylo voleno 4x a 10x. Povrch vrstev oxidu titaničitého byl fotografován digitálním fotoaparátem.

2.6 Elektronová mikroskopie (SEM)

Bylo provedeno pozorování natisknutých vrstev pomocí SEM. Byla vybrána suspenze A6a. Vrstvy TiO₂ byly naneseny na sklíčka, která byla předtím pokryta transparentní FTO vrstvou, která zajišťuje vodivost substrátu. Samotné vrstvy nebyly nijak upraveny pro zvýšení jejich vodivosti. Pouze sklíčka byla ukotvena uhlíkovou vodivou páskou. Samotné pozorování probíhalo svazkem elektronů s velikostí elektrického proudu 30 pA.

2.6 Test fotokatalytické aktivity

Pro tento test byla využita reakce kumarinu při styku s UV zářením, kdy vzniká fluorescenční produkt 7OHC. Byla sestavena aparatura sestávající ze stojanu, UV zářivky Sylvania lynx S 11W, magnetického míchadla, Red TIDE USB 650 UV, optického kabelu

P-1000-2 a počítače s programem Ocean View. Detektor fluorescence byl umístěn kolmo ke směru záření UV zářivky.

UV zářivka se zapnula půl hodiny před měřením, pro ustálení emitovaného spektra. Do křemenné kyvety byl nalit roztok kumarinu o koncentraci 10^{-4} M v množství 13 ml. Dále bylo vloženo míchadlo. Do kyvety bylo umístěno sklíčko s jednou natištěnou vrstvou oxidu titaničitého. Kyveta byla umístěna před zářivku a vedle detektor. Měření probíhalo jednu hodinu. Po uplynutí této doby se vzorek vyměnil za sklíčko se dvěma vrstvami TiO₂. Takto byly proměněny všechny vzorky včetně prázdného očištěného sklíčka.

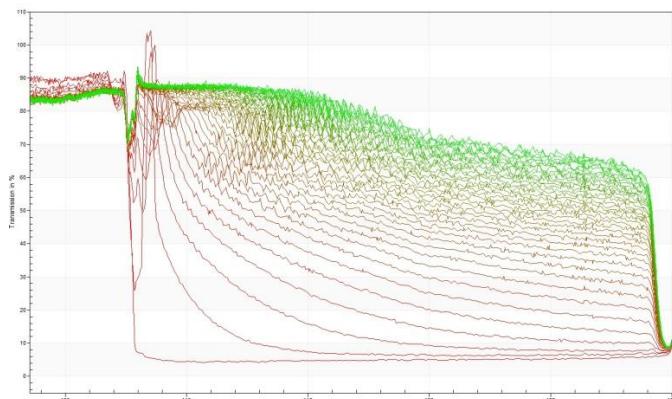
Kalibrace byla provedena pomocí roztoku 7OHC. Do odměrných baněk o objemu 25 ml bylo připraveno 11 roztoků 7OHC. Původní 7OHC měl koncentraci 10^{-6} a tento roztok byl dávkován do odměrných baněk v objemu 0 až 25 ml s krokem 2,5 ml. Odměrné baňky byly doplňovány destilovanou vodou. Postup měření byl podobný jako u samotného testu fotokatalytické účinnosti. Kyveta vždy obsahovala roztok dané koncentrace, míchadlo a prázdné očištěné sklíčko. Délka měření byla asi 5 minut, protože z důvodů stále klesající koncentrace 7OHC mělo smysl použít pouze první naměřené hodnoty.

3 Výsledky

3.1 Analytická odstředivka (LUMiSizer)

Z 12 měřených vzorků byly vyřazeny 4. A5b, A5b2 z důvodů vysoké viskozity, která nedovolovala změny při daných podmínkách a proto nebylo možné tyto vzorky měřit. Vzorky tedy byly stabilní, ale pro tisk nevhodné právě kvůli vysoké viskozitě. Aby došlo k sedimentaci, tak by bylo nutné změnit podmínky, jako třeba zvýšení otáček nebo prodloužení trvání experimentu. Další vyřazené byly D1a a D4a, protože zařízení po celou dobu zaznamenávalo prakticky stálé stejnou transmitanci a bez jakéhokoliv přechodu z oblasti okolního vzduchu a vzorku v kyvetě. To bylo nejspíše způsobeno chyboum dávkováním z důvodů vyšších viskozit vzorků.

Vzorek A6a, viz Graf 1, je příkladem polydisperzního systému. Na začátku rychle sedimentují velké částice a na konci je zákal tvořený jemnými částicemi, který sedimentuje pomalu.



Graf 1: závislost transmitance na pozici v kyvetě pro vzorek A6a

3.1 SEM

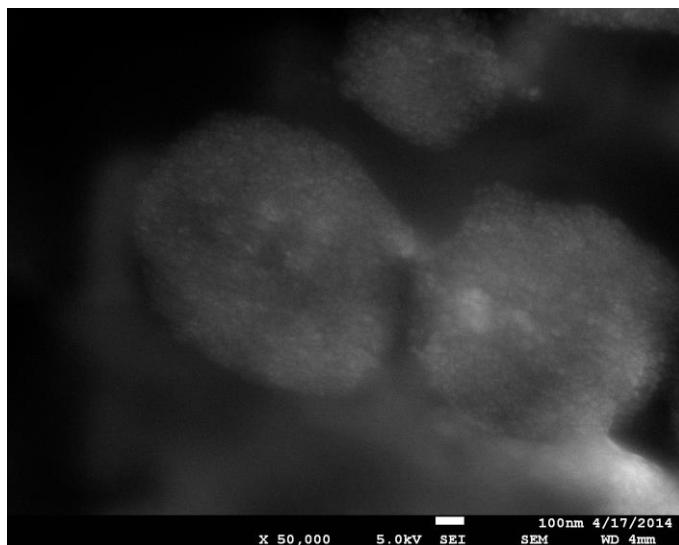
Vrstvy, které byly natištěny, byly upraveny dvěma způsoby. Jedna sada byla upravena při 100 °C, kdy bylo odstraněno pouze rozpouštědlo, a druhá sada byla žíhaná při 500 °C. Díky vysoké teplotě došlo k odstranění nejen rozpouštědla, ale i organických látek sloužících ke stabilizaci suspenze.

Všechny vzorky byly pozorovány pomocí SEM. Byly vybrány snímky pořízené při různých zvětšeních pro vzorek se třemi vrstvami natištěného TiO₂ (jak tepelně upravený při 100 °C, tak žíhaný při 500 °C) a byly pozorovány rozdíly.

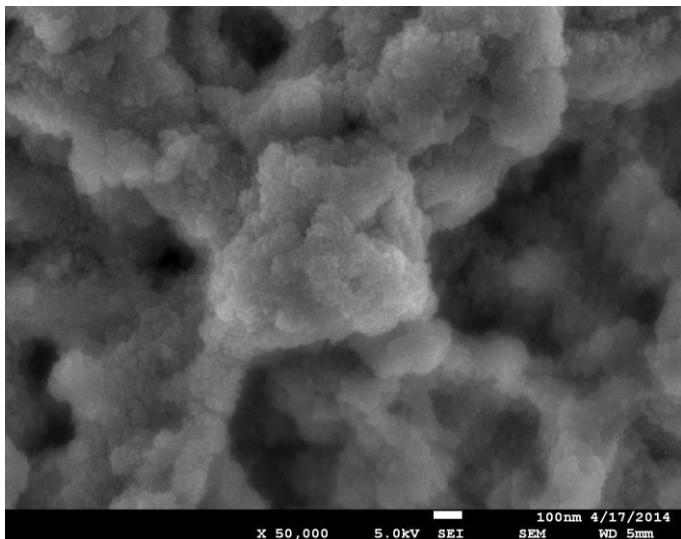
Velice důležité zjištění bylo, že povrch vzorku zahřívaný jen na 100 °C se silně nabíjel a to i když byl přicházející elektrický proud velmi malý (30 pA). Důsledkem byl šum, který zhoršoval pozorování. To nasvědčuje tomu, že částice oxida titaničitého nebyly dostatečně propojeny a tedy byla snížena jejich elektrická vodivost. Nedostatečné propojení častic mohlo být dále způsobeno přítomností organických látek, které stabilizovaly suspenzi.

Naproti tomu u vzorku, který byl žíhaný při 500 °C, nedocházelo k nabijení povrchu. Což nasvědčuje, že organické látky nebyly přítomny a částice oxida titaničitého při tak vysoké teplotě získaly krystalickou strukturu, která je elektricky vodivá a tedy byly veškeré elektrony, které by způsobovaly šum, z povrchu odvedeny.

Velikosti samotných častic oxida titaničitého byly u obou vzorků velice podobné okolo 20 nm. Ale u nežíhaného vzorku byly částice agregovány do větších útváří, micel složené z organických sloučenin, které v sobě uzavíraly nanočástice TiO₂, viz Obrázek 8. Žíhaný vzorek už neobsahoval organické součásti a nanočástice byly rozprostřeny po celém povrchu poměrně rovnoměrně, viz Obrázek 9.



Obrázek 2: tři vrstvy TiO₂, tepelná úprava při 100 °C



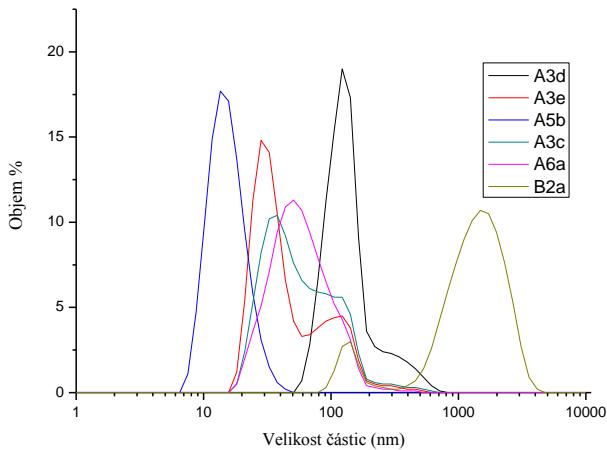
Obrázek 9: tři vrstvy TiO_2 , tepelná úprava při 500 °C

3.2 DLS

Byly proměřeny vybrané vzorky metodou DLS. Protože u vzorků C3c, D1a, D4b a D4a bylo měření nereprodukovanatelné, byly tyto vzorky dále vyřazeny. Protože pro vyhodnocování touto metodou je třeba znát viskozity disperzních prostředí, byly použity změřené viskozity vzorků A5b, A6a a B2a. Ostatní vodné vzorky měly viskozitu danou jako by šlo o čistou vodu. U vzorku A5b byla nakonec použita infinite-rate viscositi, která byla 1,03 Pa·s.

Všechny změřené vzorky se vyznačují polydisperzitou. Rozpětí velikosti částic se pohybuje od 20 do 200 nm pro vzorky A3c, A3e a A6a. U vzorku A3c je významný podíl částic o velikosti okolo 30 nm. Vzorek A3d má distribuci velikosti částic od 50 do 600 nm, kde nejvíce jich je okolo velikosti 122 nm. Vzorek B2a obsahoval částice o nevětší velikosti od 91 do 3500 nm. Největší zastoupení je okolo 1500 nm.

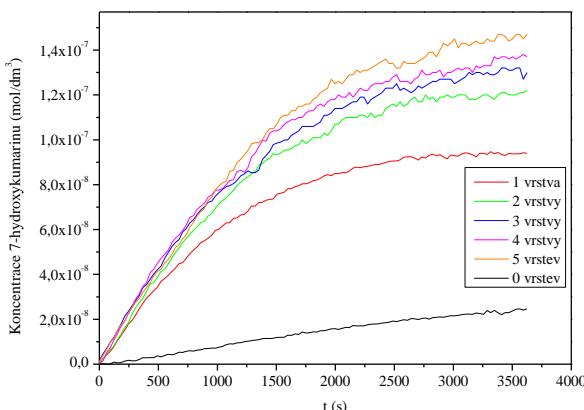
Tištěný vzorek A6a obsahoval částice o velikosti 20 až 190 nm.



Graf 2: objemové distribuce velikosti častic

3.3 Test fotokatalytické aktivity

Z měření fotokatalytické aktivity tištěných vrstev byla získána závislost intenzity fluorescence na čase ozařování. Pomocí kalibračních roztoků, které byly proměřeny, bylo možné zjistit závislost koncentrace 7OHC na čase ozařování, viz Graf 3. Z grafu je patrné, že s větším počtem vrstev oxidu titaničitého je rychleji dosaženo vyšších koncentrací 7OHC. Prázdné sklíčko také vykazovalo nárůst 7OHC, který byl způsoben reakcí kumarinu jen se samotným UV zářením. Je tedy vidět, že oxid titaničitý je skutečně fotokatalyzátorem reakce, protože s přibývajícím množstvím vrstev je rychleji dosahováno rovnováhy. Rozdíl mezi rychlosťmi reakce u jedné vrstvy a druhé je značný, ale s dalšími vrstvami se množství přibývajícího 7OHC mění mnohem méně. S dalšími vrstvami by už tedy pravděpodobně nedocházelo k dalšímu výraznému zrychlení dosažení rovnováhy.



Graf 3: závislost koncentrace 7OHC na čase ozařování UV zářením roztorku kumarinu

4 Závěr

Cílem této práce bylo připravit stabilní suspenzi oxidu titaničitého, která by byla vhodná pro materiálový tisk.

Bыло приготоено 60 образцов, из которых 10 было выбрано для дальнейших экспериментов. Выбор был основан на основе стабильности суспензии за три дня наблюдения. Параметром была такая вязкость, при которой она слишком высокая, чтобы быть подходящей для печати. Дальнейшим параметром был коэффициент крупности, который должен был быть фильтрован.

Vybraných 10 vzorků bylo podrobeno analytickým metodám zkoumajícím viskozitu, velikost částic pomocí DLS, stabilitu v těhotné poli ultracentrifugy, povrch tištěných vrstev pomocí optické a elektronové mikroskopie.

Metoda DLS zkoumala objemovou distribuci velikosti částic v suspenzích. Vzorek A5b měl velikost částic pravděpodobně mimo měřící rozsah, protože jeho korelační křivka měla velký náběh. Měření vzorků s organickými rozpuštědly nebylo reproducovatelné. Velikosti částic se pohybovaly ve většině případů v nano oblasti až na vzorek B2a, který obsahoval částice až o velikosti mikrometrů. Suspenze A6a, která byla dále používána pro materiálový tisk, měla velikost částic v desítkách nanometrů.

Vybrané suspenze byly proměněny na analytické odstředivce, která dala lepší představu o stabilitě suspenzí než jen samotné vizuální pozorování po třech dnech. Nejméně stabilní byl vzorek D4b a nejvíce stabilní byl A3d, který měl pH = 4. Vzorky s nižším nebo vyšším pH vykazovaly o něco nižší stabilitu. Vzorek A6a měl rychlosť usazování téměř dvakrát tak vysokou jako A3d. Přesto patří k stabilnějším suspenzím v porovnání s D4b.

Pozorování povrchu tištěných vrstev, kde zdrojem oxidu titaničitého byl vzorek A6a, pomocí elektronového mikroskopu ukázalo, že pro lepší provázost částic TiO₂, jejich rovnomenější rozložení po povrchu substrátu a zejména pro dostatečnou adhezi je nutné žíhání při vysoké teplotě 500 °C. Velikost částic se ve vrstvě pohybovala okolo 20 nm. Pokud byla teplota snížena na 100 °C, nedošlo k odstranění organického podílu a částice byly aglomerovány do větších celků obalených tenzidem.

Fotokatalytická aktivita byla zkoumána na produkci 7OHC z kumarinu za přítomnosti UV záření, kde byla sledována intenzita fluorescence 7OHC vyvolaná UV zářením. Tyto hodnoty byly pomocí kalibrační křivky převedeny na koncentraci 7OHC. Ze zjištěných hodnot koncentrace na čase je patrné, že vrstvy oxidu titaničitého slouží jako fotokatalyzátor a jejich aktivita ve sledovaném rozsahu tloušťek roste s rostoucím počtem vrstev, když je dosahováno rychleji rovnováhy oxidace kumarinu na 7OHC.

Klasifikace materiálu využívaného pro stavbu zahradních jezírek

Jiří Sýkora
Renata Komendová

Vysoké učení technické v Brně,
Fakulta chemická,
Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Purkyňova 464/118, 61200 Brno, ČR
xcsykoraj@fch.vutbr.cz

1 Úvod

Mnoho majitelů zahradních jezírek trápí v prvních letech provozu rychlý nárůst vodního květu a s tím i spojená snížená kvalita vody. Zahradní jezírka jsou považována za vody stojaté, díky čemuž v nich nedochází k tak velké cirkulaci, jako tomu je u vod tekoucích. Právě proto jsou zahradní jezírka v největším ohrožení v prvních letech jejich provozu, kdy se fosfor obsažený ve stavebním materiálu (kamínky, oblázky, atd.) uvolňuje do vodního prostředí jezírka a zvyšuje tak koncentraci fosforu ve vodě.

Právě proto vznikla tato práce, která poupravuje a optimalizuje, v zahraničí používanou metodu pro stanovení celkového extrahovatelného fosforu ze stavebního materiálu, který je použit v zahradním jezírku. Na základě získaných dat z experimentu je navržena klasifikace stavebního materiálu, podle uvolněného množství fosforu z materiálu. Protože je fosfor ve sladkovodních vodách limitujícím prvkem pro růst vodního květu, je zapotřebí vědět, jaké množství fosforu se může z materiálu uvolnit, aby se mohla provést opatření, která zabrání snížení kvality vody, či eutrofizaci zahradního jezírka.

Tato práce se v teoretické části také zaměřuje na výskyt fosforu a jeho sloučenin ve vodách, jejich vlastnosti, zdroje vstupu a metody stanovení v jednotlivých složkách životního prostředí s větším důrazem na vody zahradních jezírek. Dále je probírána problematika vysokých koncentrací fosforu ve vodních útvarech a s tím spojená problematika tvorby vodního květu a eutrofizace vody.

2 Experimentální část

Experimentální část této práce je zaměřena na analýzu a následnou klasifikaci stavebního materiálu pro tvorbu zahradních jezírek, podle schopnosti uvolňovat fosfor ve

formě fosforečnanů do vody. Pro tyto účely se vycházelo z rakouské normy ASC-A-0003 „Bestimmung des extrahierbaren Gesamtphosphors mit 1N HCl“.

Tato norma vychází z toho, že na jeden díl jakéhokoliv stavebního materiálu pro tvorbu zahradních jezírek případají dva díly 1 mol l⁻¹ kyseliny chlorovodíkové. Takto připravená směs kyseliny a vzorku kamení se má třepat po dobu 16 hodin. Po odstranění zákalu se čirá tekutina smísí se silným katem v H⁺ formě a intenzivně se třepe po dobu jedné minuty. Po projití katem se vzorek nařídí destilovanou vodou v poměru 1:40. K takto naředěnému vzorku se přidá 4% roztok peroxidisíranu draselného (1 díl peroxidisíranu draselného na 4 díly zředěného roztoku). Následuje inkubace při 130 °C po dobu 30 minut. Po ochlazení na pokojovou teplotu se má postupovat podle Murphy a Rileyho fotometrického stanovení z roku 1962, kdy se po aplikaci jednoho směsného činidla měří absorbance při vlnové délce 890 nm.

Po prvotním ověření upravené metody a zjištění časové závislosti doby extrakce na množství uvolněných fosforečnanů byl vzorek kamení extrahován v 1 mol l⁻¹ kyselině chlorovodíkové na třepačce při 1 000 otáčkách za minutu po dobu jedné hodiny. Následně byl extrakt přefiltrován přes filtrační papír a čirá kapalina analyzována pomocí mobilní analytiky Spectroquant® (firma Merck) na fotometru NOVA 60 od stejné společnosti. Tento postup byl postupně aplikován na dvanáct reálných vzorků z České republiky a Slovenska, které se využívají pro realizaci zahradních jezírek. Měření každého vzorku proběhlo třikrát ve třech na sobě nezávislých měřeních.

3 Závěry

U všech sledovaných vzorků byl zjištěný určitý obsah fosforu, který se během extrakce uvolnil ze stavebního materiálu. Získané hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 1,7 do 50,0 mg kg⁻¹. Na základě tohoto zjištění byla navrhнутa klasifikace stavebního materiálu do tří jakostních tříd, jako tomu je v tabulce 1.

Tabulka 1: návrh jakostních tříd.

jakostní třída	vhodný stavební materiál	méně vhodný stavební materiál	nevzhodný stavební materiál
množství uvolněného fosforu [mg kg⁻¹]	< 15	< 30	< 50

Pro přesnější klasifikaci stavebního materiálu pro tvorbu zahradních jezírek bych doporučil roztrídění nehomogenních směsí vzorků na homogenní části, ze kterých se skládají, a ty následně analyzovat zvlášť. Dále by bylo vhodné navzájem porovnávat pouze materiál o stejně velikostní frakci.

Výsledky této práce jsou pouze pilotní a i z praktického pohledu nemohou provést dokonalou klasifikaci stavebního materiálu dostupného v České republice. Pouze je navržen postup a metodika na stanovení extrahovatelného fosforu pro další praktická využití v této oblasti. Pokud by se provedla základní klasifikace nejpoužívanějších zdrojů tohoto materiálu, dalo by se při realizaci zahradního jezírka počítat s tímto množstvím uvolněného fosforu a na základě toho vycházet při úpravě vody na optimální parametry.

4 Poděkování

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR ze specifického výzkumu č. FCH-S-15-2869.

Modelling of Organic Electrochemical Transistors

Jan Truksa

*Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Materials Chemistry
Purkyněova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic
xctruksa@fch.vutbr.cz*

1 Introduction

In the recent years, organic electrochemical transistors (OECT) have been intensively researched. The components of an OECT are two electrodes, source and drain, connected by a semiconductive polymer channel. A third electrode, gate, is positioned along the channel and separated by a dielectric layer. In some cases, a solid dielectric is used, however, in the so called electrolyte gated OECTs, a buffer solution (such as Phosphate Buffered Saline – PBS) is used to separate the gate electrode. In this type of device, the electric field established in the electrolyte and channel determines OECT performance. In essence, the output current is modulated by a varying gate voltage, which dopes or de-dopes the channel with electrolyte ions¹.

Charge transport in polymers occurs mostly because of conjugated π -electrons and electron hopping. In contrast to inorganic semiconductors, polymers do not fully crystallize and often form complicated polycrystalline structures which are fragile and difficult to handle. Due to this, conductive polymers are used as thin films, deposited on a glass or plastic surface. In polycrystalline or amorphous polymers, many disorders occur in the conduction band, which is therefore less suitable for electron transport. In polymeric thin films, current conduction is heavily influenced by the presence of an electric field and temperature. Another factor is the polymer chain structure and morphology of the thin film. In this case, the charge transport is influenced by the π -electron conjugated system length and Van der Waals interactions between polymer chains. The dependence on material structure causes anisotropic behavior in polymer thin films².

For simple calculations involving temperature and electric field, the Poole-Frenkel equation (1) was reported as adequate.

$$\mu = \mu_0 e^{-\frac{\Delta_0 - \beta \sqrt{E}}{k_B T_{\text{ef}}}} \left[\text{m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1} \right] \beta = \sqrt{\frac{3 q_e}{\pi \epsilon_r \epsilon_0^2}} \cdot \frac{1}{T_{\text{ef}}} = \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \left[\text{K}^{-1} \right]. \quad (1)$$

Where μ is carrier mobility, μ_0 is zero field mobility, Δ_0 is zero field activation energy, β is the field amplification factor, E is the electric field, k_B is the Boltzmann constant, q_e is the

elementary charge, ε_r is the semiconductor relative permittivity, ε_0 is the permittivity of vacuum, T_0 is a constant³. The material conductivity can then be defined as a function of the electric field and temperature (equation 2).

$$\sigma = q_e n \mu_0 e^{-\frac{A_0 - \beta \sqrt{E}}{k_B T_{ef}}} \left[\text{S m}^{-1} \right]. \quad (2)$$

Where σ is the conductivity, n is charge carrier density.

The aim of this study is to create a functional model of an OECT with a simulation of the changes in current conduction dependent on a potential field. The software used to create the desired simulation was COMSOL Multiphysics® 5.0, a program designed to simulate complicated problems based on physics and physical chemistry through numerical methods. Most simulations employ the finite element method, but other methods, such as the finite volume or particle tracing method are also supported⁴.

Creating a model in COMSOL is done with the use of various nodes, Definitions, Geometry, Materials, Physics, Mesh, Study and Results node. In the Definitions node, the coordinate system and various variables are defined; in the Geometry node, the model can be created by hand or imported. In the Materials node, various material constants are assigned to parts of the geometry and in the Physics node, boundary conditions and equations to be used in the model are assigned. Physical equations applicable to different branches of physics are stored in the so-called Modules (e.g. the Maxwell laws can be found in the Electric Currents Module). When using multiple Modules, they must often be manually coupled together, which is generally the most challenging part of modelling in COMSOL. In the Mesh node, a mesh of finite elements across the geometry is created with preset or user defined settings. In the Study node, the simulation is computed using various settings, such as parametric sweeps, or time and frequency dependent functions. Finally, in the Results node, the computed data can be post processed by creating various plots, integration, or applying user defined functions.

2 Experimental

A two dimensional model was considered sufficient to represent the system, because significant changes happen only along the width of the channel, which translates to the x-axis. The geometry is shown in Figure 1. As the next step, the material properties were assigned. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) doped by poly(styrene sulfonic acid) (PEDOT:PSS) was assigned to channel and gate, PBS was assigned to the electrolyte, polyethylene terephthalate (PET) was assigned to the substrate and silver was assigned to the source and drain electrodes. In this part, special attention must be paid to the conductivity of PEDOT:PSS. It is meant to be dependent on the electric field; however an initial constant value of conductivity must be entered to calculate the initial electric field. The parameters used for PEDOT:PSS are shown in Table 1.

Table 1: The PEDOT:PSS parameters

Parameter name	Value
Δ_0	0.48 eV^5
n	$7.4 \times 10^{20} \text{ m}^{-3}$ ⁶
T	293.15 K
T_0	500 K
μ_0	$3.2 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ⁷
σ_0	$9\,000 \text{ S m}^{-1}$ ⁸
ϵ_r	2.2^6

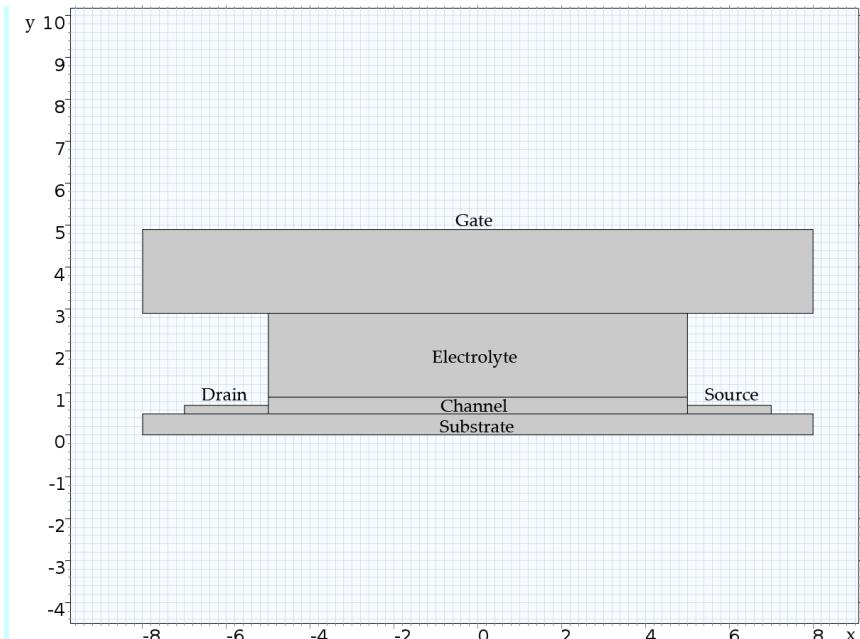


Figure 1: The OECT geometry, all measurements are in millimeters

2.1 Physics and Study Configuration

Due to the nature of this problem, at least two Modules must be employed. The first Module must always compute the initial electric field and therefore must have an explicitly set value of conductivity to σ_0 . An Electric Currents Module is sufficient for this application. This also required a corresponding Study, set to only use the first module and a Mesh had to be created. A potential of one volt was assigned to the gate electrode, a ground potential was assigned to the drain electrode and a parametric potential was assigned to the source electrode. A parametric sweep was then used as part of the study.

Once the initial field had been calculated, another Module and Study was added and made to work with conductivity defined by equation (2), while the electric field computed in the first step was used to solve for the new conductivity value. If further refinement is desired, more such steps could be added, each using the outcome of the previous step as an initial value.

To calculate the output characteristic of a transistor, the Semiconductor Module is normally used; however, this module is not suitable for organic semiconductors due to different charge transport properties and software limitations. The proper Module for organic semiconductors is not available yet. In this case, the Electric Currents Module had to be used, which does not contain the proper equations to model transistor behavior. Therefore, the output characteristic does not correspond with reality.

2.2 Results

The computed potential field for source potential of one volt is shown in Figure 2.

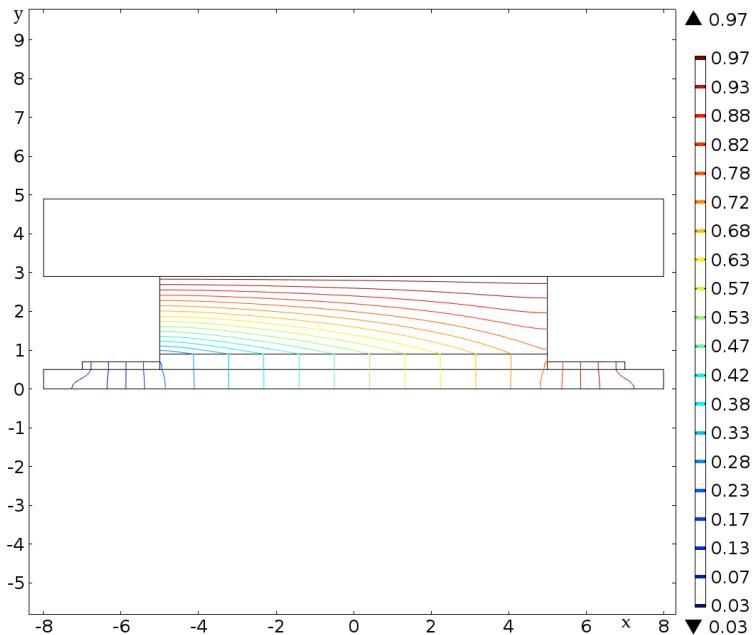


Figure 2: The computed potential field, electric potential is plotted in volts.

The output current-voltage characteristic is shown in Figure 3. As discussed before, the created characteristic is not correct for a transistor device. However, the potential field shown in Figure 2 is valid for an OECT. In order to model proper transistor behavior, a custom physics Module will have to be created in the future, as the default Modules are not suitable for use with organic semiconductors.

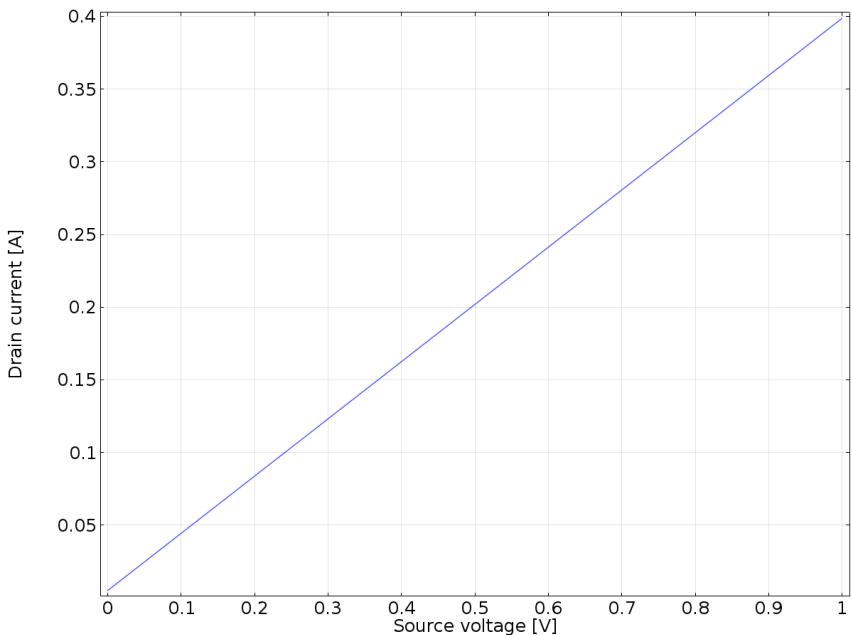


Figure 3: The computed current-voltage characteristic

4 Conclusion

The OECT model, which was created, was not completed, but it did show several problems to be considered further. Perhaps the most important of these is the need to create a custom physics Module in COMSOL, either from scratch or by modifying an existing Module (the Semiconductor Module is the likely candidate). This is quite a great task, but possibly the only way of creating realistic models in the future. Another aim for the future is to refine the used equations and try to simulate more complicated models of current conduction, such as the Disorder model.

5 References

- STRAKOSAS, X., M. BONGO and R. M. OWENS. The organic electrochemical transistor for biological applications. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2015, 2015-1-7, 132(15): 14 [Accessed on. 2015-11-17]. DOI: 10.1002/app41735. Accessible from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.41735/abstract>.

2. BHATTACHARYA, P., R. FORNARI and H. KAMIMURA. *Comprehensive semiconductor science and technology*. 1. Amsterdam: Elsevier Science, 2011. ISBN 978-044-4531-438.
3. COROPCEANU, V. et. al. Charge Transport in Organic Semiconductors. *Chemical Reviews* [online]. 2007, 2015-11-18, **107**(4): 926–952 [Accessed on 2015-11-18]. DOI: 10.1021/cr050140x. ISSN 0009-2665. Accessible from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr050140x>.
4. Comsol Multiphysics. *Comsol.com* [online]. 2015 [Accessed on 2015-11-18]. Dostupné z: <https://www.comsol.com/comsol-multiphysics>.
5. ACTON, A. *Issues in Electronic Circuits, Devices, and Materials: 2011 Edition* [online]. 1. ScholarlyEditions, 2012, 2012-1-9 [Accessed on 2015-11-20]. ISBN 9781464963728. Accessible from: https://books.google.cz/books?id=qGCJefDoh9kC&dq=pedot+pss+zero+field+activation+energy&source=gbs_navlinks_s.
6. RUTLEDGE, S. A. and A. S. HELMY. Carrier mobility enhancement in poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate) having undergone rapid thermal annealing. *Journal of Applied Physics* [online]. 2013, 2015-11-20, **114**(13): 133708 [Accessed on 2015-11-20]. DOI: 10.1063/1.4824104. ISSN 00218979. Accessible from: <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jap/114/13/10.1063/1.4824104>.
7. PETROVIC, J., P. MATAVULJ, D. QI, D. K. CHAMBERS and S. SELMIC. A Model for the Current–Voltage Characteristics of ITO/PEDOT: PSS/MEH-PPV/AI Photodetectors. *IEEE Photonics Technology Letters* [online]. 2008, 2015-11-20, **20**(5): 348–350 [Accessed on 2015-11-20]. DOI: 10.1109/LPT.2007.915586. ISSN 1041-1135. Accessible from: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=4447290>.
8. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate). *Sigmaaldrich.com* [online]. [Accessed on 2015-11-20]. Accessible from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/739316?lang=en>.

This work has been supported by the Czech Science Foundation via project No. 13-29358S and led by Assoc. Prof. Ota Salyk.

Optický senzor pro UV záření

Bc. Andrea Třešňáková

Doc. Ing. Michal Veselý, CSc.

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie

Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Česká Republika

xctresnakova@fch.vutbr.cz

1 Úvod

Účelem optického senzoru je rychle a jednoduše oznámit uživateli, zda byla překročena určená intenzita UV záření. Výhodou optického senzoru je, že k vyhodnocení nejsou třeba žádná měření ani speciální techniky, stačí pouze vizuální kontrola. Použití optického senzoru je možné, kdekoliv je potřeba rychlou a jednoduchou metodou zjistit, zda nebyla překročena limitní dávka UV záření. Základem senzoru je polymerní matrice, která obsahuje fotokatalyticky aktivní složku, redoxní barvivo a směs látek o určitém složení a poměru, která zabezpečí přilnavost k substrátu a odolnost vůči vnějším vlivům. Redoxní barvivo zde slouží jako indikátor, vlivem UV záření a fotokatalyzátoru dochází k jeho postupnému odbarvování, ostatní složky slouží ke kalibraci barevné změny systému na požadovanou dávku UV záření¹.

2 Experimentální část

2.1 Příprava kompozic

Před přípravou samotných kompozic byly namíchány nasycené vodné roztoky používaných redoxních azobarviv 1 a 2. Další kalibrační složky byly do kompozice přidávány v přesném pořadí. Takto připravená kompozice byla míchána 15 minut se skleněnými kuličkami průměru 1 mm. Poté byla suspenze zbavena kuliček a ovrstvena na polyethylentereftalátovou fólii pomocí natahovacího pravítka, v tloušťce vrstvy 60 µm.

2.2 Exponování kompozic

Po usušení byly vzorky exponované ve sluneční komoře Q-SUN s xenonovou výbojkou, simulující sluneční záření s hodnotou spektrální intenzity ozáření $0,47 \text{ W m}^{-2}$ při 340 nm, což odpovídá intenzitě slunečního záření v létě při jasně obloze v poledne v našich zeměpisných šířkách. Teplota v komoře byla nastavena na 50°C . Vzorky byly ozařovány v jednotlivých 16 minutových intervalech, odpovídající 1 standardní erythemální dávce (1 SED, 100 J m^{-2} erythemálně účinné dávky v rozsahu vlnových délek (280–400 nm). Časový interval byl spočítán ze vztahu (1), kterým lze vypočítat

erythemální efektivní účinnost zdroje, zde označený jako spektrální produkt SP . Q_λ je intenzita záření pro jednotlivé vlnové délky pokud je intenzita ozáření $0,47 \text{ W m}^{-2}$ při 340 nm a ES_λ je erythemální spektrum. Podle celkového SP , což odpovídá hodnotě $1,07 \cdot 10^{-1} \text{ W m}^{-2}$, byl spočten čas, po který je nutné ozařovat vzorek v Q-SUN. Podle vztahu (2) pro dávku 100 J m^{-2} byl spočten čas 938 s , což odpovídá 16 minutám.

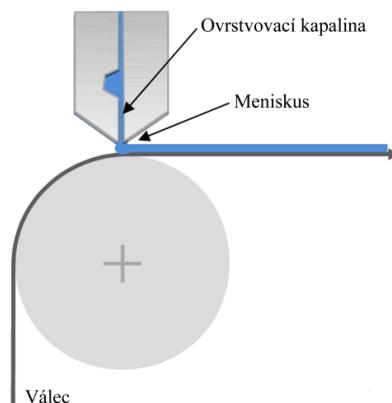
$$SP = \int_{250}^{400} Q_\lambda \cdot ES_\lambda \cdot d\lambda \quad (1)$$

$$H = E \cdot t \quad (2)$$

Pomocí spektrofotometru byla proměřena reflektance a barvové souřadnice $L^*a^*b^*$ u jednotlivých ozářených vzorků. Naměřená data byla zaznamenána do programu Excel. Pomocí programu KeyWizard byl spektrofotometr nastaven na 2° pozorovatele a osvětlení D50, celé spektrum bylo měřeno v rozsahu vlnových délek 380 – 730 nm . Spektrofotometr byl nejprve nakalibrován na bílou podložku a poté byla změřena bílá kachlička, která sloužila jako srovnávací podložka, na které byly měřeny všechny vzorky. Každý vzorek byl měřen po každém intervalu ozáření na stejném místě, které bylo vyznačeno kroužkem.

2.3 Materiálový tisk

Materiálový tisk je velmi slibnou moderní technikou, především kvůli jeho schopnosti nanášet různé materiály na různé substráty, jako je sklo, kovové desky, polymerní fólie, apod. V této práci byla použita tisková technika slot-die. Jedná se o nekontaktní ovrstvovací techniku, která se používá při potiskování velkoformátových substrátů. Hlavním účelem této techniky je vytváření plošných vrstev či proužků. Ovrstvovací kapalina je natlakována do slotu, ze kterého se přenáší na substrát za pomocí hladkého válce.



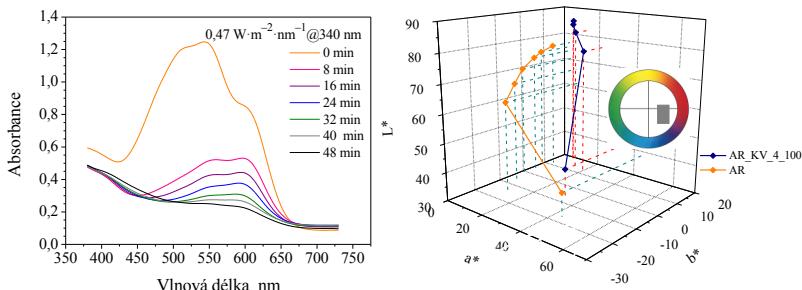
Obrázek 1: Princip ovrstvování pomocí procesu slot-die

Nanášecí hlavice (slot) je vyrobena z chirurgické oceli. Tloušťka filmu je závislá především na rychlosti ovrstvování, tlaku, velikosti mezery mezi slotem a potiskovaným

substrátem. Šířka štěrbiny je definována přídavnou vložkou, která se vkládá mezi přední a zadní část slotu. Byla použita vložka 100 µm. Plně optimalizovaná kompozice byla natíštěna na korónou ošetřenou PET fólii materiálovou tiskárnou SmartCoater (Coatema, SRN).

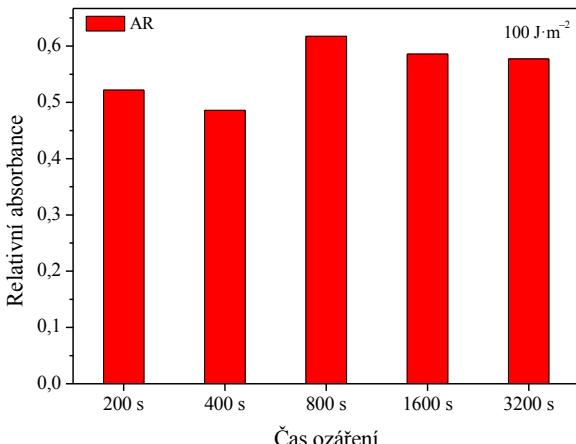
2.4 Vyhodnocení natíštěné vrstvy

Natištěná vrstva byla rozdělena na 36 políček a proměřena spektrofotometrem SpectroScan a bez vnějšího přídavného filtru byla změřena optická hustota jednotlivých políček pro purpurový filtr. Z těchto dat byla sestavena mapa optických hustot, které potvrzdily homogenitu natisknuté vrstvy – optická hustota kolísala pouze do $\pm 7\%$. Pomocí mechanického profilometru DektakXT byla zjištěna průměrná tloušťka suché vrstvy 20,4 µm.



Obrázek 2: Změřená spektra a hodnoty $L^*a^*b^*$ natíštěné kompozice obsahující směs 1. a 2. barviva

Bylo provedeno testování zákona reciprocity, který říká, že chemický účinek absorbovaného záření je roven součinu intenzity ozáření E a času t podle vztahu (2). Pomocí tohoto vztahu byla vypočtena dávka ozáření H . Pokud je zachován zákon reciprocity, potom budeme-li ozářovat vzorek vyšší intenzitou kratší čas a nebo budeme-li ozářovat nižší intenzitou delší čas a bude-li dávka ozáření stejná, bude i barevná změna ozářených vzorků stejná. Testování probíhalo pod lampou se zářivkami Sylvania LYNX 4x11 W a byla potvrzena platnost recipročního zákona pro danou expoziční dávku 100 J m⁻².



Obrázek 3: Reciproční test pod lampou se žárovkami Sylvania pro dávku ozáření 100 J m^{-2}

4 Závěry

Byl vytvořen tištěný dozimetru pro UV záření, který fotokatalytickou degradaci barviva mění barvu z fialové do žluté. Tento přechod byl pomocí kalibračních činidel úspěšně řízen. Kompozice byla úspěšně nanесена na PET fólii a byla ověřena kalibrace barevné změny připraveného dozimetru expozičními testy, měřena tloušťka nanесенé vrstvy profilometricky, VIS spektrum a pomocí denzitometrické kontroly byla zjištěna vyhovující homogenita natištěné vrstvy dozimetru. Následně byla na připravených dozimetrech ověřena platnost fotochemického recipročního zákona.

5 Literatura

1. Veselý M. a kol. Užitný vzor 28104. Úřad průmyslového vlastnictví ČR. 2015.
2. Technical Bulletin LU-8054a. Q-Lab Corporation 2013.

Poděkování: Autorka děkuje Technologické agentuře České republiky za podporu projektem TA0301548.

Svetelná degradácia kyseliny karmínovej v prítomnosti arabskej gumy

Bc. Dominika Vorčáková
Mgr. art. Zuzana Machatová

Slovenská technická univerzita v Bratislave,
Fakulta chemickej a potravinárskej technológie,
Ústav prírodných a syntetických polymérov,
Oddelenie polygrafie a aplikovanej fotochémie
Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
dominika.vorcakova@gmail.com

1 Úvod

Snaha človeka esteticky skrášľovať svoje okolie siaha hlboko do histórie ľudstva. Farby mali pre človeka už od nepamäti svoj jedinečný a symbolický význam, ktorý pretrval až dodnes. Jedným z predmetov, kde sa prejavila túžba vniesť radosť z farby je aj fotografia. Na kolorovanie čiernobielych fotografií sa využívali aj využívali aj kyselinu karmínovú.

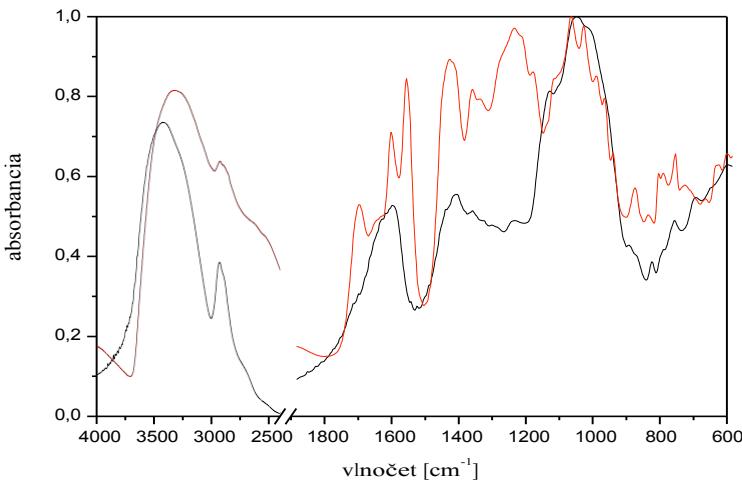
Kyselina karmínová, ktorá z hľadiska jej chemického zloženia patrí medzi antrachinónové farbivá, je súčasťou farebného extraktu z červca popálového žijúceho na niektorých druhoch kaktusov. V prírodnej podobe sa vyrába dodnes, zatiaľ čo jej syntetická výroba je veľmi náročná. Pri jej aplikovaní v maliarskych technikách, ale aj v rôznych priemyselných odvetviach je dôležité poznať jej vlastnosti a jednou z dôležitých vlastností je aj svetlostálosť.

2 Experimentálna časť

2.1 Charakteristika kyseliny karmínovej pomocou FTIR spektroskopie

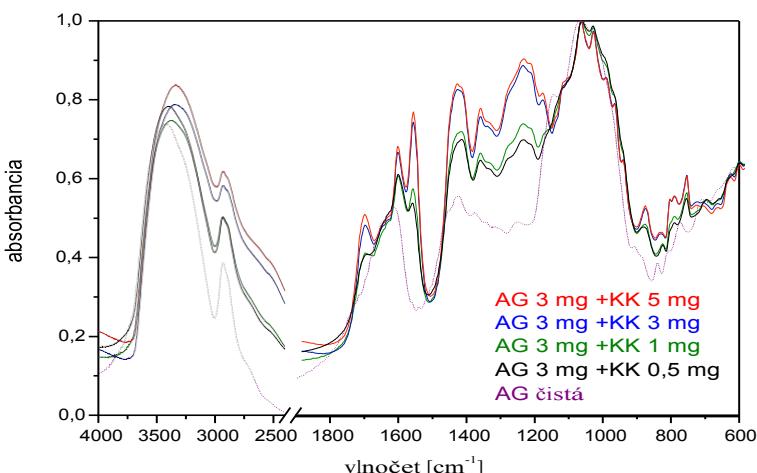
Fourierova transformačná IČ spektroskopia (FTIR) je spektroskopická metóda používaná na identifikáciu atómových funkčných skupín pri stanovení organických zlúčenín. Pri charakterizácii kyseliny karmínovej boli namerané FTIR spektrá pripravených vzoriek kyseliny karmínovej a arabskej gumy vo forme KBr tabletiek, a to v intervale 4000 až 600 cm^{-1} . Namerané spektrá sú uvedené na obr. 1. Ako môžeme vidieť, v spektre kyseliny karmínovej sa nachádzajú dva charakteristické pásy, ktoré sa v spektre arabskej gumy nevyskytujú. Tieto pásy sú v súlade s chemickou štruktúrou molekuly kyseliny karmínovej. Prvý výrazný pás pozorovaný pri vlnočte 1720 cm^{-1} je

charakteristický pre karboxylové kyseliny a pás pri 1570 cm^{-1} môže prisluchať aromatickým zlúčeninám [1].



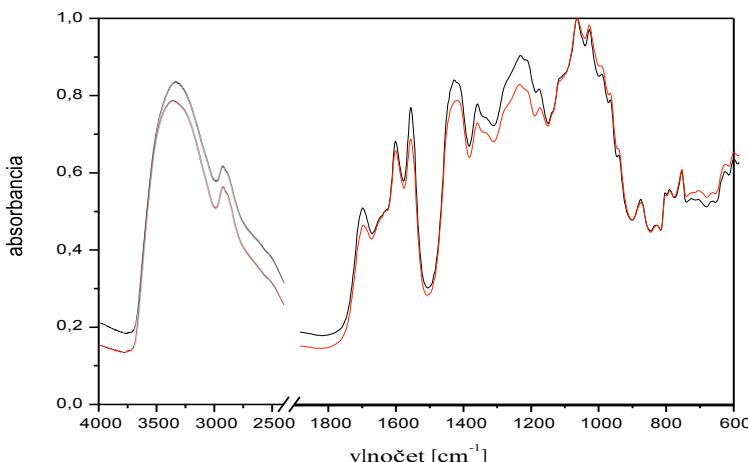
Obr. 1: Normované FTIR spektrá kyseliny karmínovej (červená) a arabskej gumy (čierna)

Ďalej boli namerané IČ spektrá arabskej gumy a kyseliny karmínovej v rôznom pomere. Ako vidieť na obr. 2, spektrá kyseliny karmínovej (KK) a arabskej gumy (AG) sa vo viacerých pásoch prekrývajú. Pre identifikáciu farebnej zložky (KK) sú dôležité práve dva už spomínané pásy, ktoré sa nevyskytujú v spektri arabskej gumy. Sú viditeľné už pri jej nižšom obsahu (1:6) a postupne narastajú s jej zvyšujúcim sa obsahom.



Obr. 2: Normované FTIR spektrá arabskej gumy a kyseliny karmínovej v rôznom pomere

Pomocou nameraných IČ spektier pre čistú arabskú gumu a kyselinu karmínovú sme pomocou programu Microsoft Excel vypočítali aj jednotlivé zmiešané spektrá. Pri pohľade na obr. 3 je vidieť, že v nameranom spektri sú pásy kyseliny karmínovej výraznejšie. Zhoda, ktorá nastala, má pomerne dobrú tendenciu, nakoľko poloha pásov vo vypočítanom spektri vyhovuje polohe pásov v nameranom spektri. Odlišnosti nastali len v pomere pásov, ktorý nie je úplne zachovaný.

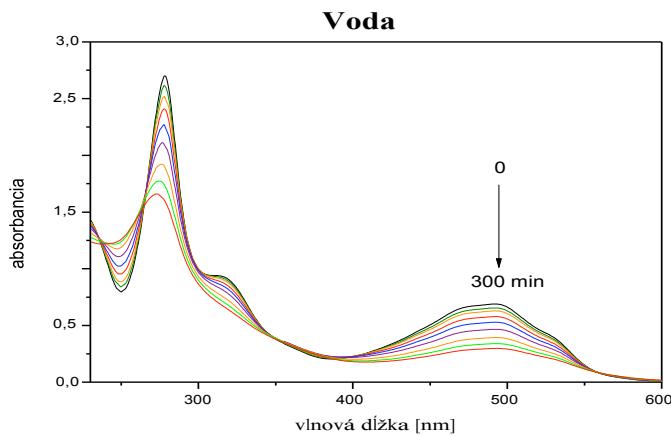


Obr. 3: Porovnanie nameraného (čierna) a vypočítaného (červená) FTIR spektra pre obsah AG 3 mg a KK 5 mg

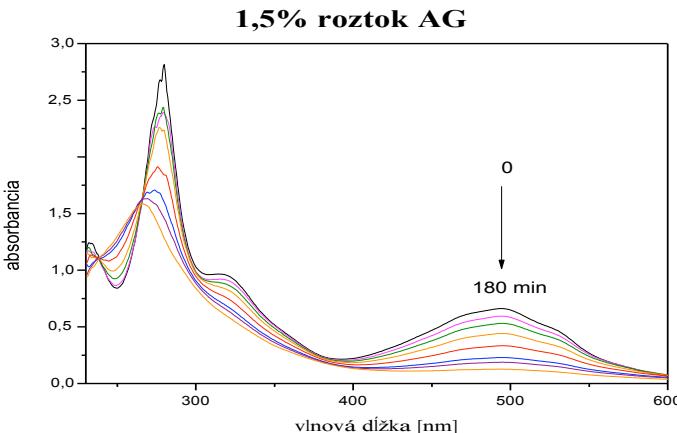
2.2 Charakteristika kyseliny karmínovej pomocou UV-Vis spektroskopie

UV-Vis spektroskopia je jedna zo základných analytických metód, ktorá sa zaraďuje medzi elektromagnetické spektroskopické metódy. Meranie touto metódou spočíva v prechode elektromagnetického žiarenia v intervale 200–800 nm roztokom vzorky sledovaní absorpcie tohto žiarenia.

Kyselina karmínová ($1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹) rozpustená vo vode s daným obsahom arabskej gumeny (AG, 0–1,5 hm.%) bola exponovaná strednotlakovou ortuťovou výbojkou. Doba expozície bola 300 minút pre roztok kyseliny karmínovej vo vode bez arabskej gumeny a vo vode s 0,5 hm.% arabskej gumeny a 180 minút pre vodný roztok kyseliny karmínovej s 1,0 hm.% a 1,5 hm.% arabskej gumeny. V čase prerušenia expozície boli merané UV-Vis spektrá, na ktorých bol sledovaný pokles absorbancie v oblasti absorpčného maxima (493 nm). Na meranie transmisných spektier roztokov kyseliny karmínovej sme používali kremennú kyvetu s hrúbkou 1 cm. S rastúcou dobou expozičie bolo možné sledovať odfarbovanie vzorky v dôsledku fotochemickej degradácie kyseliny karmínovej. Príklady nameraných UV-Vis spektier niektorých vzoriek sú zobrazené na obr. 4 a obr. 5.



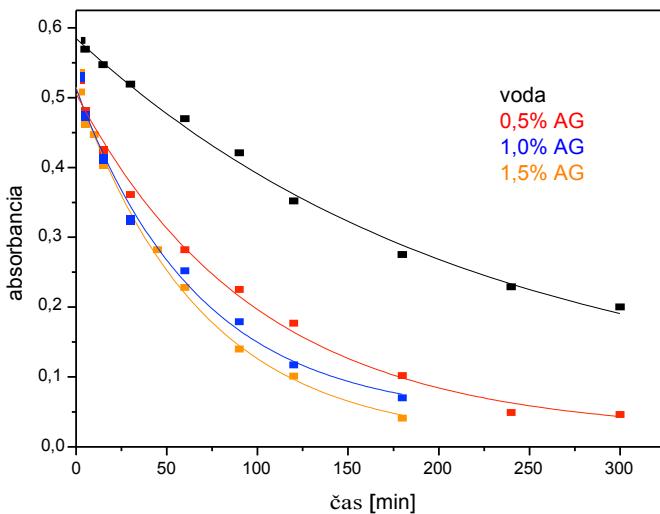
Obr. 4: Zmeny v UV-Vis spektrách kyseliny karmínovej vo vode bez AG v dôsledku jej expozičie strednotlakovou ortuťovou výbojkou



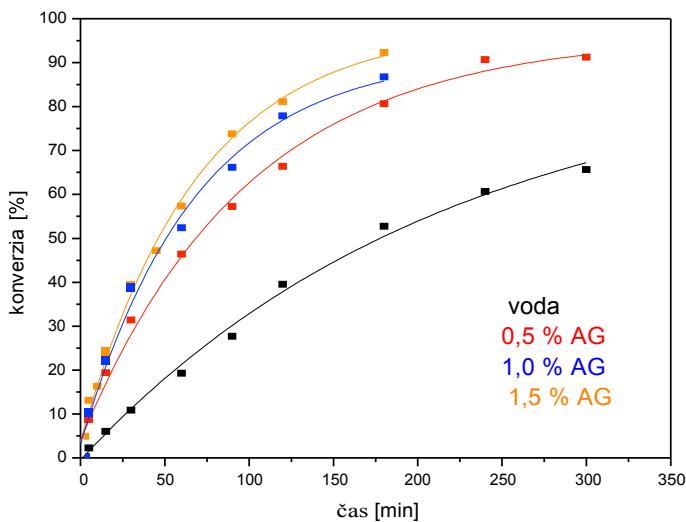
Obr. 5: Zmeny v UV-Vis spektrách kyseliny karmínovej v 1,5% roztoku AG v dôsledku jej expozičie strednotlakovou ortuťovou výbojkou

Pre názornejšie porovnanie priebehu degradácie v jednotlivých vzorkách bola spracovaná závislosť absorbancie od času (obr. 6). Následne boli pomocou rovnice (1) prepočítané hodnoty absorbancie v jednotlivých časoch $A(t)$ na konverziu $X(t)$. Veličina $A(0)$ predstavuje hodnotu absorbancie vzorky pred expozičiou (v čase $t = 0$).

$$X(t) = 1 - A(t)/A(0) \quad (1)$$



Obr. 6: Závislosť absorbancie jednotlivých vzoriek od doby expozície



Obr. 7: Závislosť konverzie jednotlivých vzoriek od doby expozície

Ako je zrejmé z obr. 6 a obr. 7, prítomnosť arabskej gumeny vo vodnom roztoku kyseliny karmínovej urýchli priebeh jej degradácie, pričom rýchlosť degradácie rastla so zvyšujúcim sa obsahom arabskej gumeny. Prítomnosť arabskej gumeny má teda negatívny vplyv na fotochemickú stabilitu kyseliny karmínovej (tab. 1).

Tabuľka 1: Porovnanie priebehu degradácie v roztokoch kyseliny karmínovej s rôznym obsahom AG

Obsah AG [%]	λ_{\max} [nm]	A_0 [-]	$A_{60\text{min}}$ [-]	$X_{60\text{min}}$ [%]	$t_{10\%}$ [min]	$t_{50\%}$ [min]
0,0	492	0,582	0,470	19,2	27,0	170,5
0,5	493	0,526	0,282	46,4	6,2	70,7
1,0	493	0,529	0,252	52,4	4,9	54,8
1,5	493	0,534	0,228	57,3	3,5	49,0

λ_{\max} - vlnová dĺžka s maximom absorbancie

A_0 - absorbancia v čase 0 min

A_{60} - absorbancia po čase 60 min

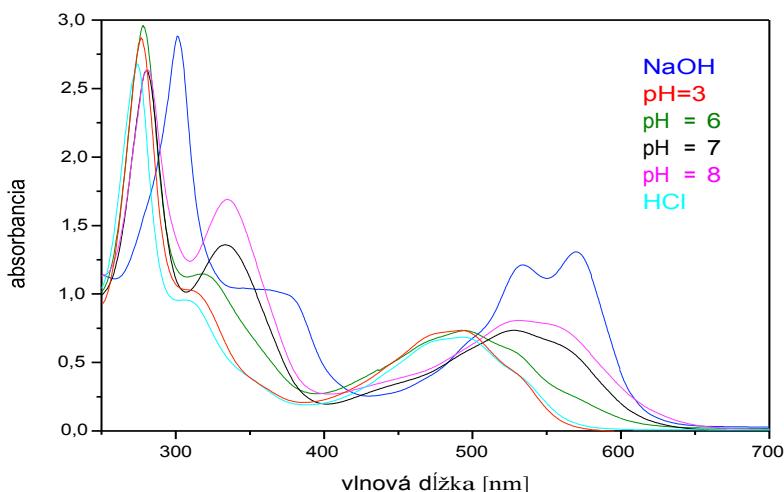
X_{60} - pokles absorbancie po čase 60 min (konverzia)

$t_{10\%}$ - čas, v ktorom poklesla absorbancia o 10 %

$t_{50\%}$ - čas, v ktorom poklesla absorbancia o 50 %

2.3 Deprotonizácia kyseliny karmínovej

Pomocou UV-Vis spektroskopie boli odmerané spektrá roztokov kyseliny karmínovej pri rôznom pH (obr. 8). Farba roztoku kyseliny karmínovej aj tvar UV-Vis spektra významne závisia od pH roztoku (obr. 9). Požadované pH bolo zabezpečené tlmivými roztokmi. Na základe UV-Vis spektier sme stanovili konštanty pKa kyseliny karmínovej.

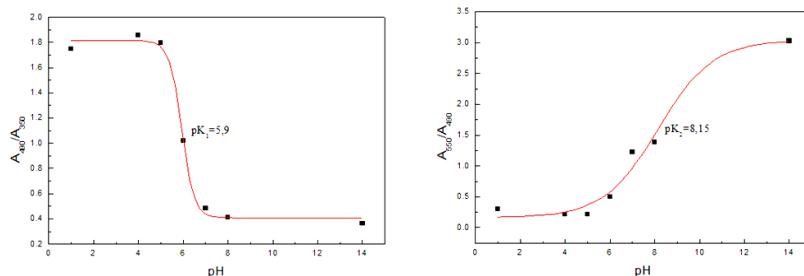


Obr. 8: UV-Vis spektrá kyseliny karmínovej v NaOH, HCl a príslušných tlmivých roztokoch



Obr. 9: Roztok kyseliny karmínovej s pH = 3 (naľavo) a pH = 8 (napravo)

Stanovenie konštanty pKa kyseliny karmínovej nie je jednoduché, nakoľko sa jedná o zložitú molekulu, ktorá obsahuje okrem $-COOH$ skupiny aj $-OH$ skupiny, ktoré tiež môžu podliehať deprotonizácii. Preto ani v UV-Vis spektrach nemôžeme identifikovať jeden izosbestický bod, ale viac priečinkov, a teda systém je charakterizovaný viacerými konštantami. V práci [2] je opísaná metóda stanovenia disociačnej konštanty na základe pomeru absorpcie pri dvoch vlnových dĺžkach v roztokoch s rôznym pH. Po vynesení tohto pomeru voči pH sa získá krivka a hodnota pK sa stanoví z inflexného bodu. Z pomerov absorbancií pri rôznych vlnových dĺžkach je možné vypočítať pre jednu zlúčeninu aj viac hodnôt. Pomocou pomeru absorbancií pri 490 a 350 nm (A_{490}/A_{350}) a pri 550 a 490 nm (A_{550}/A_{490}) boli vypočítané hodnoty $pK_1 = 5,9$ a $pK_2 = 8,15$. Na základe hodnôt uvedených v práci Favara [3] predpokladáme, že pK_1 prislúcha $-OH$ skupine, ktorá je na C6 (táto je najviac vzdialá od $-COOH$ skupiny), zatiaľ čo pK_2 $-OH$ skupine na C3 alebo C8 (obr. 10).



Obr. 10: Stanovenie pK_1 (napravo) a pK_2 (naľavo) z UV-Vis spektier kyseliny karmínovej

4 Závery

Pomocou FTIR spektroskopie boli namerané FTIR spektrá kyseliny karmínovej a arabskej gumy. Identifikovali sa pásy nachádzajúce sa v spektri kyseliny karmínovej a následne boli priradené jednotlivým funkčným skupinám. Hlavné dva pásy, vďaka ktorým je možné odlišiť spektrum kyseliny karmínovej od arabskej gumy sa nachádzajú pri 1720 cm^{-1} (priradené karboxylovým kyselinám) a pri 1570 cm^{-1} (aromatické zlúčeniny). Tieto dva pásy sú najlepšie pozorovateľné pri väčšom obsahu kyseliny karmínovej, ale je možné ich vidieť a identifikovať aj pri jej nižšom obsahu (1:6). Pri spektrách, ktoré boli vypočítané pomocou spektier čistej kyseliny karmínovej a arabskej gumy došlo k dobrej zhode s nameranými spektrami.

Metódou UV-Vis spektroskopie sme dokázali, že poloha absorpčného maxima nie je závislá od obsahu arabskej gumy, nakoľko absorpčné maximum vo viditeľnej oblasti sa nachádza pri vlnovej dĺžke 492–494 nm tak ako u jej vodného roztoku, tak aj u roztokoch s rôznym obsahom arabskej gumy. Maximum v UV oblasti sa nachádza pri vlnovej dĺžke 278 nm.

Preštudoval sa priebeh fotochemickej degradácie kyseliny karmínovej pri jej expozícii strednotlakovou ortuťovou výbojkou. Prípadok arabskej gumy urýchlił jej degradáciu, rýchlosť degradácie vzrástla asi 3x.

5 Literatúra

1. Milata, V., Segľa, P., Brezová, V., Gatial, A., Kováčik, V., Miglierini, M., Stankovský, Š., Šíma, J. 2008. Aplikovaná molekulová spektroskopia. Bratislava, 2008.
2. Reijenga, J., Van Hoof, A., Van Loon, A., Teunissen, B. 2013. Development of Methods for the Determination of pKa Values. Analytical Chemistry Insights. 2013, 8, s. 53–71.
3. Favaro, G., Miliani, C., Romani, A., Vagnini, M. 2002. Role of protolytic interactions in photo-aging processes of carminic acid and carminic lake in solutions and painted layers. Journal of the Chemical Society. 2002, 2, s. 192–197.

*Sekce studentů doktorských
studijních programů*

Tématický okruh organická, enviromentální a biochemie

Utilization of Solid Phase Microextraction for Aromaprofile Analysis of Brewer's Malt

Karolína Adámková

Martin Adam, Aleš Eisner, Karel Ventura

UNIVERZITA Pardubice, Studentská 95, 532 10 Pardubice 2

st30551@student.upce.cz

1. Introduction

Malt is one of the basic raw materials used in the production of beer and whiskey. Furthermore the malt is used for production of e.g. ethanol, lemonades, pastry and is also used in confectionery. In the Czech Republic, the market encountered especially with the lager beers, which are made from barley malt. At present there is a rising popularity of special and wheat beers. Barley and wheat malt productions are based on different grain processing technology and even they have a different sensory properties [1, 2].

Malt production for brewing purposes is based on various modifications of cereals. These are mainly the procedures such as steeping, germination and kilning [3]. These cereal adjustments regulate the activity and biosynthesis of enzymes and act on composition of the extract [4]. The concentration of aromatic compounds greatly depends on malt kilning. Aromatic substances are transformed and evaporated during this process. During kilning step there is created a pleasant taste and aroma of malt and simultaneously unpleasant taste and aroma of green malt are removed. Compounds forming malt aroma and flavor are especially acids, alcohols, aldehydes, ketones, esters, and heterocyclic compounds containing oxygen, nitrogen or sulfur. Furthermore products of Maillard reactions and even other reactions are contributed to aroma profile as well. During kilning there are also degraded fatty acids, lipids of grain to produce a series of substances having generally unpleasant aroma. Maillard response in light malts is not so significant contrary to dark malts. In this case there are produced more intermediates, which are converted to aromatics in the brewing process. These include e.g. ketosamines (Amadori products) [5–7].

Malts like the other plant materials is a complex matrix, so it is difficult to isolate sensory active substance. To obtain the overall flavor profile, experiments are focused on the isolation and pre-concentration of volatile substances. A suitable method for getting a large amount of aromatic compounds seems to be solid phase microextraction from headspace (HS-SPME). It is a method of saving the time and any solvent consumption [8, 9]. The technique of SPME is still more and more used and the fields of application have been continuously growing, including a wide range of food analysis, namely the volatile

composition of wines beers, honeys, and teas. The technique gained growing acceptance and increasing use in routine laboratories and industry [10].

The purpose of the Design of Experiment (DOE) method is to change the conditions of measurements in order to obtain optimal procedure for the experiment and also get information on the properties and behavior of materials. Each plan should include the number of steps of the experiment, the conditions of individual experiments and order tests. Planning objectives of the experiment are then to quantify the level of significance of each of the factors, that affect and determine the levels of these important factors, so that the experiment was optimal and stable [11].

2. Experimental

2.1 Instrumentation

For the extraction of volatiles from the malt samples was used a 50/30 μm DVB/CAR/PDMS fiber and holder for manual sampling (both Supelco, Bellefonte, PA, USA) were used. The target compounds were identified by computer matching with commercial mass spectral libraries and by evaluation of retention indices related to n-alkanes. A Shimadzu gas chromatograph (GC 17A) equipped with a DB-5MS capillary column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm , J&W Scientific, Folsom, CA, USA) coupled with mass spectrometer detector QP-5050A with quadrupole mass spectrometer (both Shimadzu, Kyoto, Japan) was used during the study. As the carrier gas was used ultrapure helium (Linde Gas a. s., Praha, CZ) at a linear velocity of 30 cm/s. The injector temperature was 250 °C and the HS-SPME desorption time was 1 min. For injection was the variable split ratio (1:6 or 1:3) was used. The oven temperature program was: 35 °C (held for 2 min) and then increased to 270 °C at 6 °C/min). The mass spectrometer was operated in the electron impact (EI) ion source mode at 70 eV. The transfer line and the ion source temperatures were set at 230 °C.

The MS data were compared with the libraries of mass spectra NIST, WILEY and FFNSC. From the chromatographic data retention times were used for calculations of the retention indices, which were compared to online databases of NIST and the VCF and data in MS libraries. To assess the optimal conditions was used STATISTICA 12 (Dell Inc., Round Rock, TX, USA).

2.2 Samples

The first half of the samples malts were given from floor malt house in Záhlinice (The Czech Republic) and the second half of the samples were given of brewery Primátor (Náchod, The Czech Republic). Both of these contractors provide both types malts samples (barley and wheat). In this study 10 malt samples of various ages, types and from different manufacturers were analyzed.

2.3 Extraction procedure

In this arrangement of the experiment sample and fiber are not heated together during the extraction. The sample is immersed in a heated water bath, whilst the fiber is located in the headspace, which is for the sorption of volatile substances on fiber far preferable. The parameters that influence the effectiveness of HS-SPME for analysis of volatile compounds in brewing malts samples were optimized. The whole optimization had two steps. The experimental design of Plackett-Burman identified significant factors for the experiment and Centrally Composite Design of Experiments (CCD) and serving to estimate the best experimental conditions.

2.4 Design of Experiment by Plackett-Burman

A total of 11 factors were selected for DOE by Plackett-Burman. The upper (+1) and lower (-1) levels of these factors were arranged in 12 experiments (Table 1), from which the most effective experiment was performed in triplicate. Selected factors and two levels are defined in Table 2.

Table 1: Design of Experiment by Plackett-Burman

Experiment	Factor										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
3	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Table 2: Selected factors and their levels of Plackett-Burman Experiment Design

Factor		-1	1
A	Grinding	NO	YES
B	Weight of Sample	1 g	3 g
C	Addition of Salt	without Addition	30 g/100 mL
D	pH Adjustment	Without Adjustment	Adjusted to pH 2 (CH_3COOH)
E	Shaking	0 s	10 s
F	Temperature of Incubation	30 °C	80 °C
G	Time of Incubation	5 min	20 min
H	Temperature of Extraction	30 °C	80 °C
I	Time of Extraction	5 min	30 min
J	Time of Desorption	15 s	1 min
K	Volume of the Liquid Phase	2 mL	6 mL

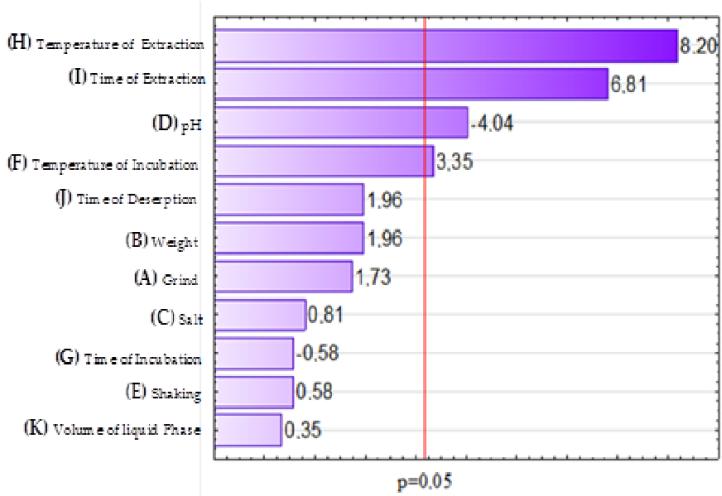


Figure 1: Pareto diagram with marked level of significance ($p = 0.05$) for the total number of substances

Plackett-Burman's evaluation was held by the STATISTICA 12 software, where the results were entered into the Pareto chart (Figure 1 and 2). First chart (Figure 1) shows the significance of factors for obtaining the greatest number of peaks. From this point of view factors like extraction temperature, extraction time, adjusting the pH and temperature of

incubation were found to be significant at p value 0.05. These four important factors were further optimized using Central Composite Design of Experiments. Optimal values of the remaining factors were established using a one-dimensional experiment (volume of the liquid phase 5 ml, 5 seconds shaking, incubation time 15 minutes, without adjusting the ionic strength, desorption time of 1 min, and sample weight 3 g).

Second Pareto chart is focused on the significance of factors in view of the total area of the peaks. Crushing has proved the most important factor, because the further optimization was carried out using only malt crushed. It is evident that with the exception of the shaking time all selected factors are significant for the total area of the peaks. These dependencies must be taken with caution as the significance of factors that may have influenced some of the most intense peaks with a large surface.

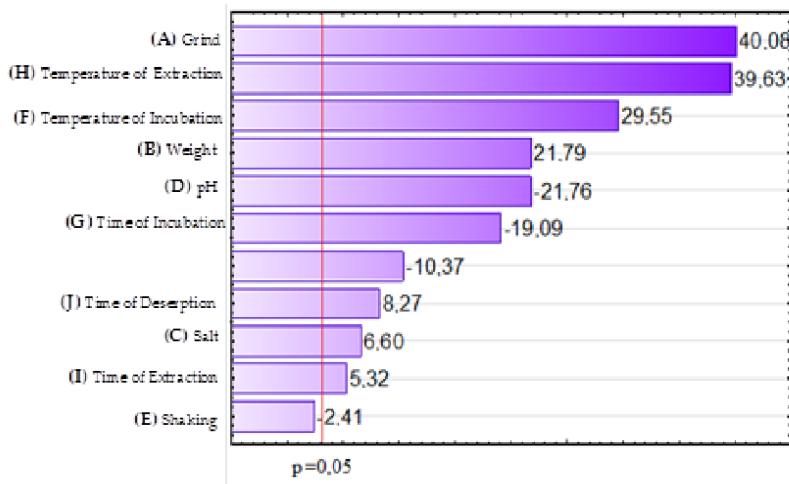


Figure 2: Pareto diagram with marked level of significance ($p = 0.05$) for the total peak area

2.5 Central Composite Design of Experiment

Optimization of pH, extraction temperature, extraction time and temperature of incubation, as important factors of the experiment carried out according to Table 3, where the points 1–8 and 11–18 are experiments of factorial design and the points 21–28 are star points. Experiments marked with letter C (9, 10, 19, 20, 29 and 30) characterized the repetition in the center.

Table 3: Experimental CCD matrix of the design optimization of the important factors SPME experiment

Experiment	pH Adjustment	Temperature of Extraction (°C)	Time of Extraction (min)	Temperature of Incubation (°C)
1	3	45	15	75
2	3	45	35	45
3	3	75	15	45
4	3	75	35	75
5	5	45	15	45
6	5	45	35	75
7	5	75	15	75
8	5	75	35	45
9 C	4	60	25	60
10 C	4	60	25	60
11	3	45	15	45
12	3	45	35	75
13	3	75	15	75
14	3	75	35	45
15	5	45	15	75
16	5	45	35	45
17	5	75	15	45
18	5	75	35	75
19 C	4	60	25	60
20 C	4	60	25	60
21	2	60	25	60
22	6	60	25	60
23	4	30	25	60
24	4	90	25	60
25	4	60	5	60
26	4	60	45	60
27	4	60	25	30
28	4	60	25	90
29 C	4	60	25	60
30 C	4	60	25	60

Evaluation was carried out using STATISTICA 12, which resulted in a total six of response surfaces. These areas represent the correlation of various factors and generate the suitability of 10 compounds for which the optimization is evaluated.

It was necessary to find a compromise between conditions suitable to obtain the largest number of substances and conditions suitable for an adequate response (Table 4).

Table 4: Optimal conditions as a result of the evaluation of CCD for two different dependent variables (response of 10 substances, and the total number of peaks)

Optimal conditions for the response 10 of selected compounds – the result of CCD				
independent variable	Adjusting the pH	Temperature of Extraction	Time of Extraction	Temperature of Incubation
optimum value	2	70 °C	40 min	30 °C
Optimal conditions for obtaining the greatest number of substances – the result of CCD				
independent variable	Adjusting the pH	Temperature of Extraction	Time of Extraction	Temperature of Incubation
optimum value	4	90 °C	30 min	90 °C
Selected the optimum for finding compromise between as many materials and adequate response				
independent variable	Adjusting the pH	Temperature of Extraction	Time of Extraction	Temperature of Incubation
optimum value	2.5	90 °C	40 min	90 °C

2.6 Optimization of fixed extraction temperature

All extractions were performed in 20 mL glass vials sealed with PTFE-faced septum caps (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The analyzed sample (3 g) was transferred into the sampling vial and was added 5 ml of sulfuric acid solution of pH 2.5. After mixing on a shaker was vial with suspension placed in a hot air oven, where took place incubation at 90 °C for 15 minutes. Immediately after incubation the vial was transferred into a water bath on the basis of a heated also to 90 °C where it was started HS-SPME for 40 min. Then was cleaned the SPME fiber at Hamilton syringe cleaner after desorption of the analytes from the fiber in the spraying space GC-MS instrument.

2.7 Optimization of two extraction temperatures

The extraction temperature was evaluated at 90 °C by optimizing as appropriate. This temperature is rather high, which influence may occur the desorption of analytes back into the headspace from the fiber. It was therefore appropriate to include a second lower temperature. The optimum extraction time was chosen as 40 minutes. The question remains how this time shared between two extraction temperatures. Was therefore carried out a series of measurements with different time ratios (10:30; 15:25; 20:20; 20:15; and 30:10 min) of two extraction temperatures of 90 and 10 °C. The evaluation based on the number of peaks, see Figure 3. Time ratio 20:20 min two extraction temperature was based as optimum. Also, comparison of the two chromatograms testifies to the suitability of a combination of two extraction temperatures. Red is here marked area where the chromatogram was enriched with the more volatile materials in the combination of two

extraction temperature in the ratio 20:20 min, while in the case of extraction at a fixed temperature of 90 °C top chromatograph is depleted of substances with lower boiling points.

The procedure was exactly the same as for the extraction at a fixed temperature with the difference that the extraction was divided into two steps. First, the vial with adjusted sample was transferred from the hot air dryer to a water bath at 90 °C, where the extraction took place for 20 minutes. From there, the whole vial with the fiber was displaced to another water bath at 10 °C, where the extraction continued for another 20 minutes. Desorption and purification were again the same as in the prior extraction.

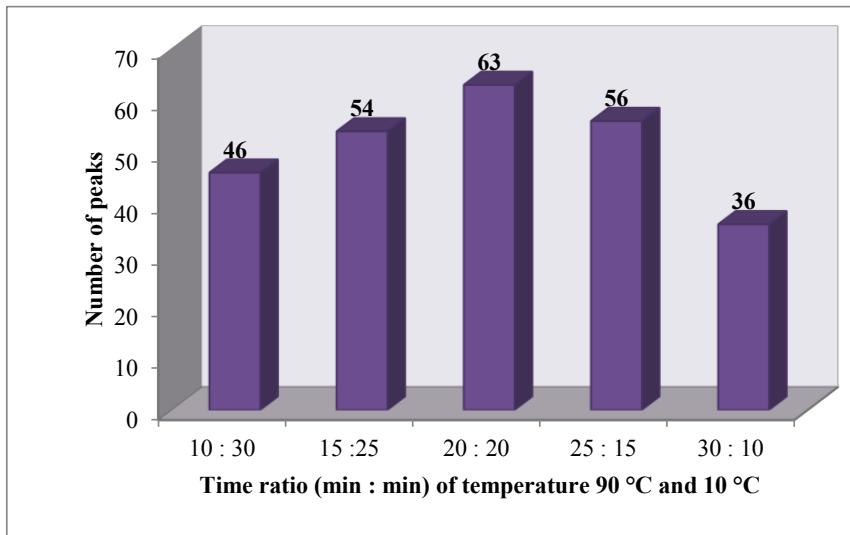


Figure 3: Total number of peaks depending on the time ratio (min : min) at 10 °C and 90 °C

3 Conclusion

By HS-SPME method under optimal conditions and the inclusion of two combinations of extraction temperatures in one step were analyzed two types of malts from two different suppliers were analyzed. For a more precise identification was based not only on libraries MS spectra were calculated but also the retention indices and these were compared with available databases. For a sample of barley malt, which provided brewery Primátor was detected 51 compounds, and 7 of them had not been identified. For wheat malt from the same well of the brewery Primátor was able to detect 57 compounds and 16 of them had not been identified. For barley malt produced floor malt house in Záhlinice were detected 63 compounds and 19 of them had not been identified. Wheat malt from Záhlinice contained 82 compounds and 34 of them could not be identified.

4 References

1. BASAŘOVÁ, G.; ŠAVEL, J.; BASAŘ, P.; LEJSEK T. Brewery, Theory and Practise of beer production. Praha: VŠCHT, 2010, s. 4–833. ISBN 978-80-7080-734-7.
2. VELÍŠEK, J., The chemistry of food. Whiley Blackwell, 2014. ISBN 978-1-11-838384-1.
3. DEPREATERE, S. A.; DELVAUX, F.; COGHE, S.; DELEVAUX, F.R., Wheat Variety and Barley Malt Properties: Influence on Haze Intenzity and Foam Stability of Wheat Beer. *Journal of the Institute of Brewing*. 2004. 110 (3), s. 200–206. ISSN 0046-9750.
4. AGU, R. C.; PALMER, G. H., Areassessment of sorghum for lager-beer brewing. *Bioresource Technology*, 1998. 66 (3), s. 253–261. ISSN 0960-8524.
5. CEJPEK, K., Aroma and Taste Compounds in Malts. *Chemické Listy*. 2014. 108, s. 426–835. ISSN 1212-7103.
6. DAMM, E.; KRINGSTAD, H., Volatile Carbonyl Compounds in Barley and Malts. *Journal of the Institute of Brewing*. 1964. 70 (1), s. 38–42. ISSN 2050-0416.
7. VELÍŠEK, J., The chemistry of food. Whiley Blackwell, 2014. ISBN 978-1-11-838384-1.
8. MÜLLER, L.; GÓRECKI, T.; PAWLISZYN, J., Solid-phase Microextraction in Analysis of Pollutants in the Field. University of Waterloo, Canada, Encyclopedia of Analytical Chemistry. 2000. ISBN 0471 97670 9.
9. RISTICEVIC, S.; VUCKOVIC, D.; LORD, H. L.; PAWLISZYN, J., Analytical Techniques for Scientists .Comprehensive Sampling and Sample Preparation. (Waterloo) Elsevier. 2012, s. 419–460. ISBN 978-0-12-381374-9.
10. VENDECAN, S. M. G.; SAISON, D.; SCHOUUPPE, N.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F. R., Optimisation of specialty malt volatile analysis by headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spektrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2010. 671, s. 55–60. ISSN 0003-2670.
11. GONZÁLEZ, A. G.; GONZÁLEZ-ARJONA, D., Computational program for evaluating and optimizing response-surface curves based on central composite designs. *Analytica Chimica Acta*, 1994. 298 (1), s. 65–73. ISSN 0003-2670.

Steady-State Fluorescence Spectroscopy Techniques in Determination of Phospholipids Vesicles Properties

*Jana Burdíková
Filip Mravec, Miloslav Pekař*

*Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Physical and Applied Chemistry
Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic
xcszewieczkovaj@ch.vutbr.cz*

1 Introduction

Phospholipids are naturally occurring surface active agents, self-aggregating into lipid vesicles (liposomes). Liposomes are suitable for encapsulation both hydrophobic and hydrophilic compounds, therefore can be potentially used as a component of drug delivery system. The determination of their properties play important role in the development of these new drug delivery systems.

Steady-state fluorescence techniques represent powerful tool for determination of great variety of phospholipids vesicles properties. Phase transition temperature is one of the most important characteristics of liposomes. It is commonly determined by means of calorimetric technics¹. Prodan derivative laurdan is due to presence of lauric acid chain tightly anchored within the membrane. The naphthalene moiety of laurdan, which is located near to lipids headgroup area, is sensitive to the polarity of local environment. Upon excitation increases its charge separation, which causes surrounding solvent dipoles reorientation. This decreases the probe's excited state energy. Thus, laurdan emission spectrum is influenced by the presence of water molecules in the vicinity of laurdan naphthalene moiety. By analyzing generalization polarization of laurdan emission spectra as a function temperature we obtained equally reliable results as in the case of calorimetry techniques^{2,3}.

The aggregation behavior of lipid molecules can be studied using polarity sensitive fluorescence probes such as pyrene or perylene. The pyrene emission polarity index is calculated from the pyrene emission spectra. The dependence of pyrene emission polarity index on the lipid concentration has sigmoidal character. Its point of inflection corresponds to critical aggregation concentration of the lipid. On the other hand, perylene fluorescence from polar environment is really weak. Thus, the dependence of total integral of perylene emission spectra on lipid concentration has increasing character, and critical aggregation concentration is found as a break in this increase.

1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) fluorescence anisotropy measurements can be utilized for investigation of lipid order. DPH allows obtaining information about physical

changes in membranes through measurement of degree of membrane fluidity. The essence of fluorescence anisotropy is hidden in determination of the molecular orientational order and reorientational dynamics of the fluorescent probe in the core of the membrane bilayer⁴.

2 Experimental

Phospholipids were dissolved in chloroform. After evaporation of the chloroform, water was added to achieve a phospholipid concentration of 1 g dm⁻³ and the solution was sonicated for 60 minutes at 45 °C.

Then, different fluorescence probes dissolved in acetone were pipetted into vials to achieve a final fluorescence probe concentration in the order of magnitude 10⁻⁷ M. After evaporation of the acetone, stock solution of phospholipid was added to these vials.

Samples were measured by fluorescence spectroscopy using a Fluorolog HORIBA Jobin Yvon instrument after 24 hours of agitation.

2.1 Materials

6-Dodecanoyl-2-Dimethylaminonaphthalene (Laurdan); 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH); pyrene; perylene, 4-(4-(Dihexadecylamino)styryl)-N-Methylpyridinium Iodide (DiA); 3,3'-Diocadecyloxacarbocyanine Perchlorate (DiO), Lecithin, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC).

2.2 Microcalorimetry studies

The microcalorimetry studies were done using thermal activity monitor TAM III (TA Instruments, New Castle, Delaware, US). 2.5 g of phospholipid stock solution was placed into the disposable crimp seal ampoules. Samples were equilibrated for 15 min at 25 °C. The scanning rate was set to 2 °C/h. Measurements were carried out in the temperature range 25–60 °C.

2.3 Laurdan generalized polarization

The characteristics of laurdan emmission spectrum describing the presence/absence of water molecules in the vicinity of laurdan molecule may be expressed by the generalized emission polarization value (GP)⁵.

$$GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad (1)$$

where I_{440} and I_{490} are the fluorescence intensities measured at 440 nm and 490 nm (Parasassi, 1990, 1998) because laurdan emission maxima at 440 nm and 490 nm occur in gel phase and in a liquid-crystalline phase, respectively^{2,6}. The phase transition temperature was determined from the first intersection of three straight-line segments fitting the laurdan GP versus temperature plots.

2.4 DPH fluorescence anisotropy

The samples were excited at 355 nm and the DPH emission was measured at 435 nm with slit adjusted to 5 nm. Every measurement was repeated at least ten times to achieve standard error lower than 2 %. Effective lipid order parameter (S_{eff}) was calculated as follow⁷:

$$S_{eff} = \left(\frac{r}{0.4} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

where r is the observed anisotropy and 0.4 represents the intrinsic anisotropy (r_0) of the molecule, which refers to the anisotropy observed in the absence of other depolarizing processes such as rotational diffusion or energy transfer⁸.

2.5 Pyrene emission spectra evaluation

Pyrene emission spectra were measured in the range of 360–540 nm with an excitation wavelength of 335 nm. From these spectra, the emission polarity index (EmPI) was obtained from the ratio of the fluorescence intensities of the first (373 nm) and third (383 nm) bands^{9,10}. Fluorescence intensities of the excimer band (470 nm) and monomer band (373 nm) were used to calculate the excimer:monomer ratio (Ex:Mo).

The dependence EmPI on the phospholipid concentration was then fitted by means of a Boltzmann sigmoid curve and the critical aggregation concentration (CAC) was obtained as its point of inflection.

2.6 Perylene emission spectra evaluation

Perylene emission spectra were measured in the range of 430–550 nm with an excitation wavelength of 410 nm. Total integral of these spectra was as a function of lipid concentration determined. CAC was obtained as a point of intersection of two straight lines fitting data.

2.7 DiA and DiO emission spectra evaluation

DiA and DiO emission spectra were measured in the range of 500–650 nm with an excitation wavelength of 460 nm and 485 nm, respectively. Total integral of these spectra was as a function of lipid concentration determined. CAC was obtained as a point of intersection of two straight lines fitting data.

3 Results and discussion

Comparsion of phase transition temperature of DPPC obtained by means of microcalorimetric technique and Laurdan GP is shown in the Figure 1. The dependence of Laurdan GP on temperature was fitted by three straight lines and the phase transition temperature was obtained as a first point of intersection. Measured values of phase transition temperature were quite similar: 42.06 °C and 41.92 °C using microcalorimetry and Laurdan GP, respectively.

The degree of lipid chain order in DPPC vesicles was studied by DPH fluorescence anisotropy. Anisotropy reached a value of 0.33, which corresponds to effective lipid order parameter of 0.91. If we compare these results with those from literature⁷ where the complex model lipid constructs were studied, then we can conclude, that lipid chains in DPPC vesicles are quite ordered.

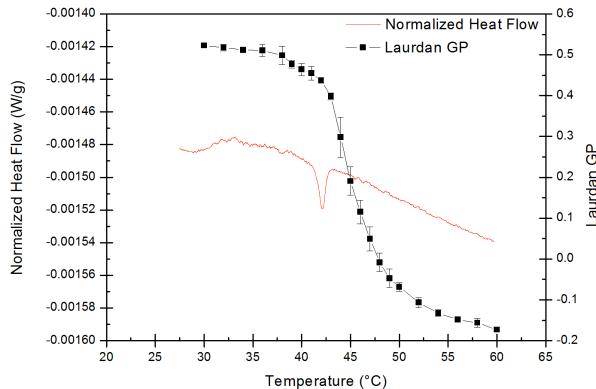


Figure 1: Normalized heat flow and Laurdan GP as a function of temperature, in DPPC vesicles

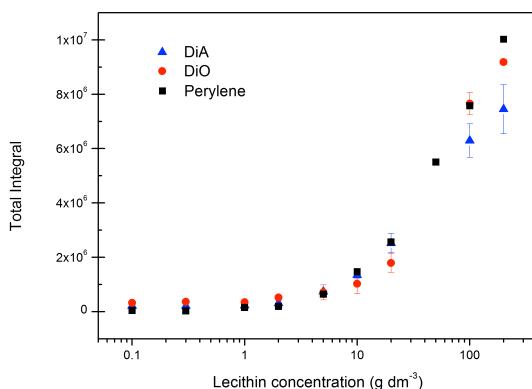


Figure 2: Total integral of DiA, DiO and Perylene emission spectra as a function of Lecithin concentration

Figure 2 illustrates the dependencies of total integral of DiA, DiO and perylene emission spectra on lecithin concentration. We observed high similarity of these dependencies and obtained CACs (listed in Table 1) despite of different character of these three fluorescence probes. DiA and DiO have hydrocarbon chain and headgroup

anchored in the vicinity of lipid polar headgroups, meanwhile perylene has hydrophobic character, therefore is located in the acyl chain region.

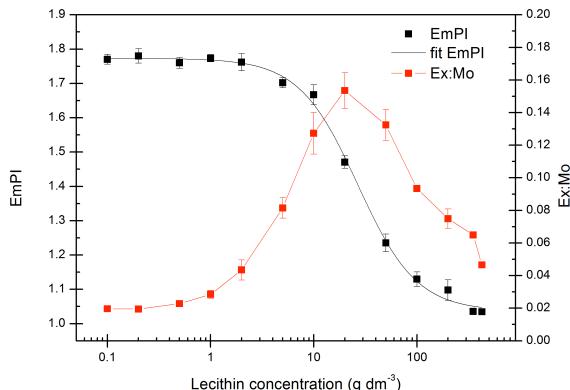


Figure 3: Pyrene EmPI and Ex:Mo as a function of Lecithin concentration

Pyrene EmPI and Ex:Mo as a function of lecithin concentration is shown in the Figure 3. CAC obtained as a point of inflection of Boltzmann curve fitting data was slightly higher than those obtained by means of DiA, DiO and Perylene (Table 1).

Table 1: Lecithin CAC measured using different fluorescence probes

Fluorescence probe	CAC (g dm⁻³)
DiA	15.6
DiO	17.3
Perylene	15.9
Pyrene	26.7
Average	18.9 ± 5.3

4 Conclusion

Phase transition temperature, lipid order parameter and lipid aggregation were studied by means of steady-state fluorescence techniques. Phase transition temperature was observed at nearly the same temperature as using microcalorimetry. According to results of DPH fluorescence anisotropy measurements, lipid chains in DPPC vesicles are quite ordered. Second part of this work was concerned on lecithin aggregation study using different fluorescence probes. Results of CAC were nearly same, only in the case of pyrene CAC was slightly higher.

5 References

1. HEERKLOTZ, H. The microcalorimetry of lipid membranes. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2004, vol. 16, p. 441–467.
2. PARASASSI, T., KRASNOWSKA, E. K., BAGATOLLI, L., GRATTON, E. Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes. *Journal of Fluorescence*. 1998, vol. 8, no. 4, p. 365–373. DOI: 10.1023/A:1020528716621. ISSN 10530509.
3. BONDAR, O., ROWE, E. S. Preferential Interactions of Fluorescent Probe Prodan with Cholesterol. *Biophysical Journal*. 1999, vol. 76, no. 2, p. 956–962. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77259-0. ISSN 00063495.
4. MULLER, J. M., van GINKEL, G., van FAASSEN, E. E. Effect of Lipid Molecular Structure and Gramicidin A on the Core of Lipid Vesicle Bilayers. A Time-Resolved Fluorescence Depolarization Study. *Biochemistry*. 1996, vol. 35, no. 2, p. 488–497. DOI: 10.1021/bi951409h.
5. PARASASSI, T., DE STASIO, G., D'UBALDO, A., GRATTON, E. Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal*. 1990, vol. 57, no. 6, p. 1179–1186. DOI: 10.1016/S0006-3495(90)82637-0. ISSN 00063495.
6. SANCHEZ, S. A., TRICERRI, M. A., GUNTHER, G., GRATTON, E. Laurdan Generalized Polarization: from cuvette to microscope. MÉNDEZ-VILAS, A. (ed.) a J. DIAZ (ed.). *Modern research and educational topics in microscopy*. Badajoz, Spain: Formatex, 2007, p. 1007–1014. ISBN 9788461194209.
7. TROUP, G. M., WRENN, S. P., APEL-PAZ, M., DONCEL, G. F., VANDERLICK, T. K. A Time-Resolved Fluorescence Diphenylhexatriene (DPH) Anisotropy Characterization of a Series of Model Lipid Constructs for the Sperm Plasma Membrane. *Industrial*. 2006, vol. 45, no. 21, p. 6939–6945. DOI: 10.1021/ie058084d.
8. LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006, xxvi, 954 p. ISBN 03-873-1278-1.
9. GHOSH, S., BURMAN, A. D., De, G.C., DAS, A. R. Interfacial and Self-Organization of Binary Mixtures of Anionic Amphiphiles in Aqueous Medium. *Journal of Physical Chemistry B*. 2011, vol. 115, p. 11098–11112. DOI: 10.1021/jp204223t.
10. MITRA, D., CHAKRABORTY, I., BHATTACHARYA, S. C., MOULIK, S. P., ROY, S., DAS, D., DAS, P. K. Physicochemical Studies on Cetylammonium Bromide and Its Modified (Mono-, Di-, and Trihydroxyethylated) Head Group Analogues. Their Micellization Characteristics in Water and Thermodynamic and Structural Aspects of Water-in-Oil Microemulsions Formed with Them along with n-Hexanol and Isooctane. *Journal of Physical Chemistry B*. 2006, vol. 110, p. 11314–11326. DOI: 10.1021/jp055720c.

Acknowledgement (This work was supported by Project Nr. LO1211, Materials Research Centre at FCH BUT- Sustainability and Development (National Programme for Sustainability I, Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic).

Analysis of Organic Compounds in Tar Produced by Thermochemical Conversion of Biomass

Radek Hájek

Václav Chytíl, Milada Vávrová, Martin Lisý

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry

Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection

Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

xchajekr@fch.vutbr.cz

1 Introduction

In recent times, the global effort is made to find such a source of energy which would replace the use of fossil fuels for another, possibly renewable technology. Biomass is the most common form of renewable energy and there are several ways how to obtain it¹. Biomass combustion counts among basic technological procedures. Another way of biomass processing comprises of gasification techniques, which leads to production of combustible gas mixture usable in cogeneration devices.

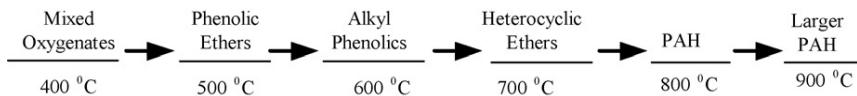


Figure 1: Scheme of Tar Maturation²

One of the most important advantages of these thermo-chemical conversion processes is represented by their CO₂ balance. These processes contribute no "new" carbon dioxide to the atmosphere and therefore can be considered as a relatively pure way of energy generation. However, there are still some potentially harmful substances formed as for example fine dust particles, inorganic nitrogen and sulphur compounds. Residual amounts of various organic compounds, especially phenols, volatile compounds (BTEX), organic acids, alcohols, esters and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) cause difficulties both in combustion and gasification facilities and in the environment, too. These substances condense as a complex mixture known as tar. Tar composition depends on many factors, e.g. on the fuel type, its humidity and the operating temperature (see Figure 1). From this reasons it is essential to develop preparative and analytical methods for tar analysis in order to optimize tar production processes and increase the economical and ecological potential of this technology³.

2 Experimental

The tar samples for the analysis were taken from the experimental combustion unit GEMOS 110 kW at the Energy Institute of Faculty of Mechanical Engineering of BUT. The tar produced by combusting of various biological materials (wood chips, chipboard, sorrel and cereal straw) was collected in special cooled system of impinger bottles half-filled with acetone. This method is described as recommended in Tar Protocol⁴. The samples used for the analysis are listed in Table 1.

Table 1: Overview of samples collected for the analysis

Probe number	Fuel Type	Combustion Temp. [°C]
1	wood chips	830
2	wood chips	770
3	wood chips	830
4	chipboard	780
5	sorrel	820
6	cereal straw	780

2.1 Sample preparation

The choice of preparative method strongly depends on the properties of target compounds. BTEX and phenolic compounds are characterized by their volatility, therefore the samples were just filtered through paper filter (80 g m²) to remove suspended particles and diluted with acetone in the ratio 1:5.

On the other hand, to make the analysis of PAH possible, only the specific fraction of condensate was selected. Like in the case of BTEX and phenols, the samples were first filtered through the paper filter. Then the pretreatment on the column chromatography was conducted. The columns were filled with fine silica gel (mesh 60 Å, activation time 3 hours at 180 °C). Small amount of silica gel was mixed in the vial with 1 ml of sample and the solvent was evaporated carefully under the nitrogen stream. Tar accumulated on the silica gel particles was transported to the upper part of the column. Light hydrocarbons as e.g. alkanes which would interfere with PAH during analysis were then washed out by 10 ml of hexane, consequently the fraction containing PAH was eluted by 50 ml of hexane-dichloromethane mixture (1:1), while the polar fraction remained fixed on the silica gel. To the eluate 100 µl of undecane was added as a keeper and the mixture was vacuum-evaporated. Finally, the thickened sample was dissolved in 3 ml of isoctane and analysed using gas chromatography coupled by mass spectrometry.

2.2 Analysis of samples

Two methods were developed for the gas chromatographic analysis of the samples. BTEX and phenolic compounds were determined on the DANI Master device equipped with capillary column Supelco SLB-5MS (30 m, i. d. 0.25 mm, thickness of the stationary phase 0,25 µm) and flame ionization detector. The method had following parameters: column temperature program: 70 °C for 1 min. To 100 °C at 3 °C/min, then to 300 °C at

20 °C/min, hold for 5 min; injector: split, 1:10; injector temperature: 280 °C; detector temperature: 310 °C; injection volume: 0.5 µl; carrier gas: hydrogen.

The other GC method used an Agilent 6890N gas chromatograph equipped with primary column Supelco SLB-5MS (30 m, i. d. 0.25 mm, thickness of the stationary phase 0.25 µm) and secondary column SGE BPX50 (1.29 m, i. d. 0.1 mm, thickness of the stationary phase 0.1 µm). The method had following parameters: primary column: column temperature program: 50 °C for 1 min. To 220 °C at 10 °C/min, then to 300 °C at 5 °C/min, hold for 12 min; secondary column: column temperature program: 60 °C for 1 min. To 230 °C at 10 °C/min, then to 310 °C at 5 °C/min, hold for 12 min; injector: splitless; injector temperature: 280 °C; transfer line temperature: 280 °C; injection volume: 1 µl; carrier gas: helium. For the detection of analytes the LECO Pegasus III TOF MS was used with following parameters: ion source: electron ionisation (70 eV); ion source temperature: 250 °C; detector voltage: 1 750 V; m/z range: 50 to 400; scanning frequency: 100 spec./min.

The compounds were identified quantified by comparing with retention time of standards and their peak area. In case of GC-MS the reference spectra were used for precise determination, too.

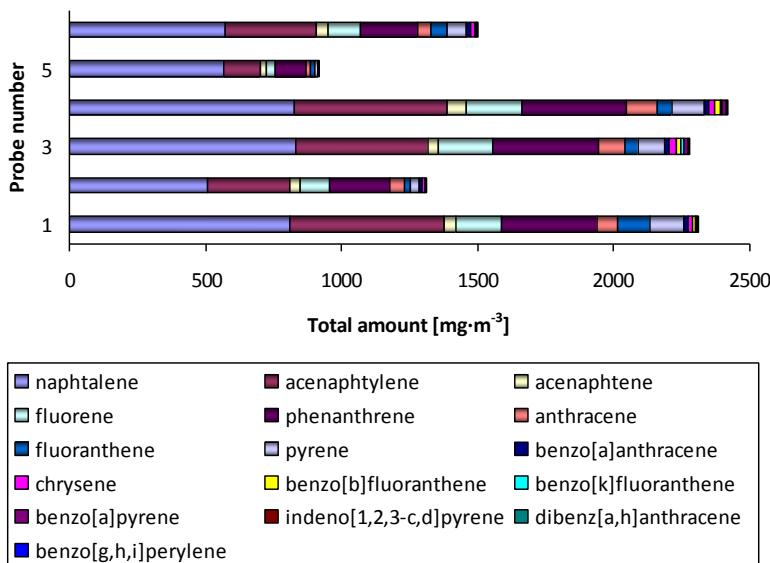


Figure 2: Amount of polycyclic aromatic hydrocarbons in tar samples

4 Conclusion

Within the scope of this pilot study the amount of BTEX, phenolic compound and PAH was determined. Gas chromatography represents suitable and relatively quick

method of chemical analysis. However, the different behavior of the compounds demands specific way of preparation for each group of them. Therefore the simple preparative and analytical methods for analysis of tar samples were introduced.

From the BTEX the most abundant were benzene and toluene. From the assessed phenolic compound only phenol was present in significant amounts in the samples. Column chromatography used as a pretreatment step showed up the average efficiency of 66.7 %. The most detected compound of PAH was represented by naphtalene, which amount exceeded one third of total PAH amount in all samples determined by GC-TOF-MS. With increasing molecular mass of PAH decreased their abundance in samples, as expected. Concentrations of PAH in the tar samples are showed in the Figure 2. However, from the obtained results no evidence of connection between composition of tar and the fuel type can be seen.

There is no doubt about the negative impact of substances produced by biomass combustion and gasification on the human health and the environment. Therefore is needed to be engaged of potential hazards and risks of these technologies.

5 References

1. MCKENDRY, P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technology*. 2002, vol. 83, issue 1, s. 37–46. DOI: 10.1016/s0960-8524(01)00118-3.
2. ELLIOTT, D. C. Relation of reaction time and temperature to chemical composition of pyrolysis oils. In: Proceedings of the ACS symposium series 376, pyrolysis oils from biomass. Editors Soltes, E. J., Milne, T. A., 1988.
3. LI, Ch., SUZUKI, K. Tar property, analysis, reforming mechanism and model for biomass gasification – An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2009, vol. 13, issue 3, s. 594–604.
4. NEEFT, J. P. A. et. al. Guideline for Sampling and Analysis of Tar and Particles in Biomass Producer Gases. Energy project ERK6-CT 1999–2002.

Plants as a source of bioactive compounds with antimicrobial and antiurease properties

Sherif T. S. Hassan^{a,b}

Kateřina Berchová^b, Milan Žemlička^a and Khaled T. S. Hassan^c

^aDepartment of Natural Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42, Brno, Czech Republic

^bDepartment of Applied Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of LifeSciences Prague, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchdol, Czech Republic

^cDepartment of Forestry and Wood Technology, Faculty of Agriculture, Alexandria University, Aflaton st., El-Shatby 21545, Alexandria, Egypt
sherif.hassan@seznam.cz

Infectious diseases still remain the main cause of morbidity and mortality among humans, especially in developing countries. Plants remain the main source of biologically active substances with great bioavailability, low toxicity, less resistance and various mechanisms of action. Therefore, their application in the treatment of microbial infections has gained much interest in research field. In this study, we evaluated selected invasive plants and their main bioactive compounds for their antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*, herpes simplex virus type 1 (HSV-1), hepatitis C virus (HCV), *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* as well as antiurease activity. Antimicrobial activity was determined by the broth microdilution method. Urease activity was evaluated using mass spectrometry-APCI technique. *Ecballium elaterium* and *Cirsium arvense* were the most active plants with antimicrobial properties against all tested microbs. Cucurbitacin B was the most active isolated compound with remarkable antimicrobial and antiurease activities. In conclusion, we suggest that *Ecballium elaterium* and *Cirsium arvense* have potential therapeutic applications in the treatment of infectious diseases.

Keywords: invasive plants; bioactive natural products; infectious diseases; enzyme inhibition.

The author didn't submit the contribution before the proceedings deadline.

Fluorescence Study of Effect of Hyaluronan Addition to Micelle Solution of Cetyltrimethylammonium Bromide

Petra Holíková
Miloslav Pekař

*Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Physical and Applied Chemistry
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno
xcucekajova@fch.vutbr.cz*

1 Introduction

The study of interaction between hyaluronan and surfactant were subject of several previous studies. Due to negative hyaluronan charge almost all of them used cationic surfactants. Phase behaviour of systems containing alkyltrimethylammonium bromides (8–16 carbons), hyaluronan, water and salt (mostly NaBr) were investigated by Thalberg et al.^{1–5} The NMR, methods of phase separation, conductivity, solubilization of dyes etc. were used. Thalberg found that there is a certain cationic surfactant concentration above it marked formation of hyaluronan-surfactant complexes can be observed. Increasing salt concentration prefers free micelles in comparison than formation of hyaluronan-linked micelles. Fluorescence probes (pyrene, nile red) and tensiometry⁶ were used for determination of critical aggregation concentration (below the critical micellar concentration) of hyaluronan-surfactants system in physiological solution. Yin et al.⁷ used pyrene fluorescence to investigate interactions of high molecular weight hyaluronan with anionic sodium dodecyl sulphate, nonionic Cremophor EL and Tween 80 in water.

In this paper, we report the results of fluorescence study, especially steady-state measurement of fluorescence anisotropy, with perylene and fluorescein in the cationic micellar solution of CTAB above the critical micellar concentration after the addition of low molecular weight hyaluronan. The fluorescence anisotropy can be used for determining the viscosity in the nearby area of the molecule fluorescent probes. This method characterizes the extent of linear polarization of fluorescence emission, resulting from photoselection from an optically isotropic sample.

2 Experimental

2.1 Materials, preparation of samples

Cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) of the best available purity was purchased from Sigma-Aldrich and used as received. Hyaluronan of low

molecular weight (90–130 kDa) was purchased from Contipro Biotech s. r. o., Czech Republic. Stock solution of hyaluronan in water was prepared in concentration 0.3 g l⁻¹ by slowly adding solid hyaluronan into water under stirring, followed by 24 h stirring in closed vessel to ensure complete dissolution. Stock solution of CTAB in water was prepared in concentration 5 mmol l⁻¹. Fluorescence probes perylene (Fluka) and fluorescein (Sigma-Aldrich) were also used without further purification. Stock solution of perylene was prepared in acetone and stock solution of fluorescein was prepared in methanol. All chemicals used were analytical grade. Water used to prepare all solutions was doubly distilled (Milipore Academy).

At first, the stock solution of perylene/fluorescein was added to the glass vials and then the acetone/methanol was evaporated. The final concentration of this probe in samples was 2×10^{-6} mol l⁻¹. Then, the solutions of CTAB and hyaluronan were added in a particular ratio (0–50 vol. % of hyaluronan solution). In the sample with 10 vol. % of hyaluronan solution, the ratio of micelles/hyaluronan chains is 150/1, for sample with 50 vol. % hyaluronan, the same ratio is 16/1. The samples were left on a shaker for 24 hours at room temperature. Individual samples were blended three times. The excitation and emission spectra, intensity of fluorescence, steady-state anisotropy of fluorescence and lifetime of the samples were measured.

2.2 Instrumentation

The steady-state measurements of fluorescence (excitation and emission spectra, fluorescence anisotropy) were carried out on a luminescence spectrophotometer Fluorolog (HORIBA Jobin Yvon) with 150-W xenon lamp as the excitation. Anisotropy measurements were realized in L-format instrumental configuration and an automatic interchangeable wheel with Glan-Thompson polarizers. The value of fluorescence anisotropy was determined as

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}}, \quad (1)$$

where the subscripts of the fluorescence intensity values (I) refer to horizontal (VH) and vertical (VV) orientation of polarizers. The G factor (instrumental correcting factor) was automatically determined by the software supplied by the manufacturer. The integration time was chosen to 2 s. The anisotropy measurement on the one sample was carried out five times and the result was average value of anisotropy. Individual samples were blended three times. For samples with perylene, the excitation wavelength was set to 410 nm and emission was elected to 440 nm, for samples containing fluorescein, the excitation wavelength was set to 480 nm and emission was set to 520 nm. Temperature of the sample chamber was set on 25 °C.

Total fluorescence intensity of the sample was evaluated according to equation

$$I_{\text{total}} = I_{VV} + 2I_{VH}. \quad (2)$$

The lifetime was measured on TCSPC lifetime spectrofluorometer Fluorocube from HORIBA Jobin Yvon. The samples containing perylene were excited by the NanoLED diode 389 nm (pulse width 1.2 ns) and the emission was observed at 440 nm. The samples with fluorescein were excited by the NanoLED diode 455 nm with pulse width 1.2 ns and

the emission monochromator was set on 520 nm. The lifetime was measured at orientation of polarizers in magic angle and peak preset was set to 10 000 counts. Temperature of the sample chamber was set on 25 °C.

3 Results and discussion

3.1 Micellar hydrophobic interior

In order to obtain information about structural changes of micellar interior after the addition of hyaluronan to the CTAB solution, we have carried out fluorescence anisotropy measurement with hydrophobic probe perylene, which is essentially insoluble in water. Perylene has been often used to evaluate microviscosity of hydrophobic core of ionic⁸ and nonionic⁹ micelles, due to its high limiting anisotropy ($r_0 = 0.369$)¹⁰, high fluorescence quantum yield (0.94 in cyclohexane)¹¹ and low fluorescence lifetime (4.60 ns in chloroform)¹². Perylene behaves as nonisotropic rotor considering its planar disk-like molecule¹³.

Figure 1 shows the results obtained for anisotropy of fluorescence and total intensity of fluorescence of perylene in micellar medium as a function of volume of hyaluronan solution in the sample. As can be seen, total fluorescence intensity in the samples which contain hyaluronan, is roughly constant and it is little bit smaller than clear CTAB solution. The anisotropy of fluorescence slightly increasing, this fact is probably caused by reduction of micellar size.

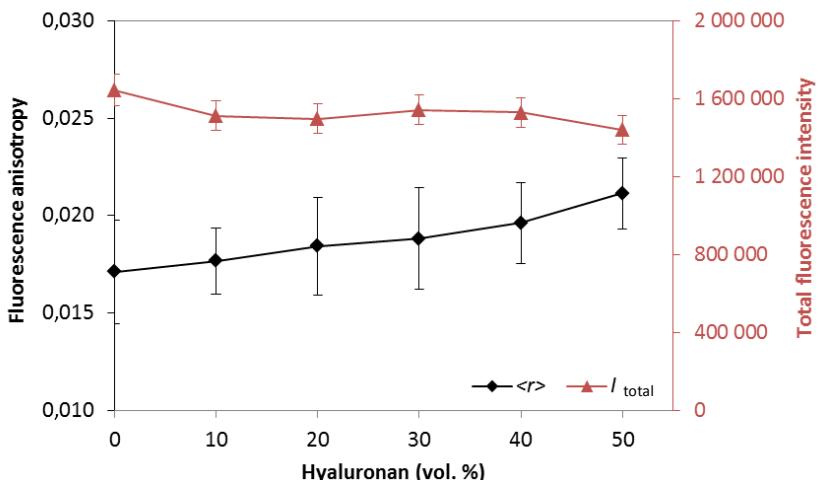


Figure 1: Steady-state anisotropy of fluorescence and total intensity of fluorescence of perylene in CTAB solution as a function of volume of hyaluronan solution in the sample.

Perylene has one lifetime $\tau = (5.801 \pm 0.014)$ ns in all samples, thus presence of hyaluronan in CTAB solution did not affect its lifetime. Also Figure 2 shows the

normalized excitation and emission spectra of perylene in micellar solution of CTAB and mixture 50/50 CTAB/hyaluronan solution. As we can see, the presence of hyaluronan in solution of CTAB did not affect the spectra of perylene.

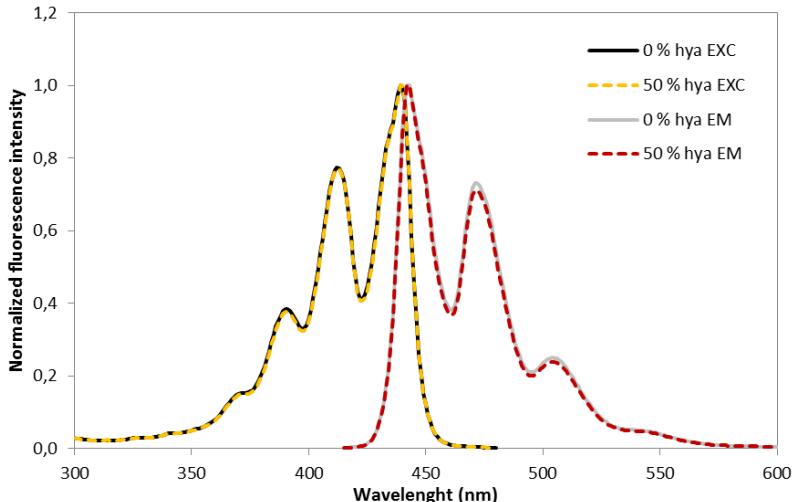


Figure 2: Normalized excitation and emission spectra of perylene in CTAB solution and mixture 50/50 CTAB/hyaluronan solution.

3.2 Micellar interface

To obtain structural and microviscosity changes at micellar interface induced by presence of hyaluronan, we have carried out measurements of fluorescence anisotropy of fluorescein solubilized in micellar solution of CTAB. Anionic character of fluorescein ensures its micellization on the surface of positively charged CTAB micelles due to electrostatic interactions. In fact, several spectroscopic studies previously reported have shown that the fluorescein molecules are solubilized in the inner part of Stern layer of CTAB micelles¹⁴. Accordingly, changes in fluorescein anisotropy of fluorescence reflect changes in structure/microviscosity at the micellar surface.

Figure 3 shows the results obtained for fluorescence anisotropy and total fluorescence intensity of fluorescein in micellar solution of CTAB as a function of volume of hyaluronan solution in the sample. As can be seen, total fluorescence intensity is roughly constant. Compare to that, the value of anisotropy of fluorescence significantly increases from 20 vol.% of hyaluronan solution in the sample, which indicates that the micellar surface is affected by hyaluronan addition – microenvironment near the molecules of fluorescein has higher and higher viscosity.

In the samples, fluorescein has one lifetime $\tau = (4.371 \pm 0.004)$ ns in all samples, so presence of hyaluronan in CTAB solution did not affect its lifetime. Figure 4 shows comparison of the normalized excitation and emission spectra of fluorescein in micellar solution of CTAB and mixture 50/50 CTAB/hyaluronan solution. As we can see, the presence of hyaluronan in solution of CTAB did not affect the spectra of fluorescein like its lifetime.

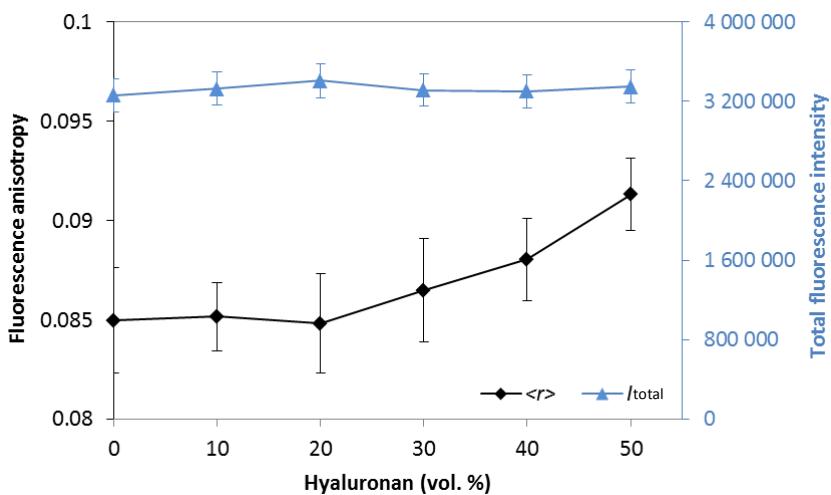


Figure 3: Steady-state anisotropy of fluorescence and total intensity of fluorescence of fluorescein in CTAB solution as a function of volume of hyaluronan in the sample.

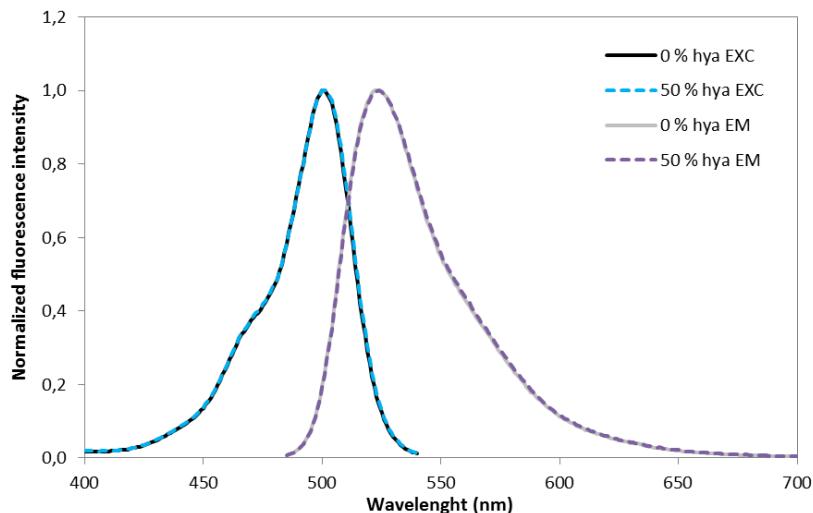


Figure 4: Normalized excitation and emission spectra of fluorescein in CTAB solution and mixture 50/50 CTAB/hyaluronan solution.

4 Conclusions

Using analysis of photophysical response of two fluorescence probes located in different region (hydrophobic core and surface) of CTAB micelles, we have obtained information about its microstructural changes after the addition of hyaluronan.

It is observed, that the addition of hyaluronan to micellar solution of CTAB affected structural changes of microenvironment near the molecules of both fluorescence probes, which are reflected at increasing values of fluorescence anisotropy simultaneously with increasing amount of hyaluronan in solutions.

5 References

1. THALBERG, Kyrre a Bjoern LINDMAN. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *The Journal of Physical Chemistry*. 1989, vol. 93, issue 4, s. 1478–1483. DOI: 10.1021/j100341a058.
2. THALBERG, Kyrre. a Bjoern. LINDMAN. Gel formation in aqueous systems of a polyanion and an oppositely charged surfactant. *Langmuir*. 1991, vol. 7, issue 2, s. 277-283. DOI: 10.1021/la00050a013.
3. THALBERG, Kyrre., Bjoern. LINDMAN a Gunnar. KARLSTROEM. Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide-hyaluronan-water. *The Journal of Physical Chemistry*. 1990, vol. 94, issue 10, s. 4289–4295. DOI: 10.1021/j100373a075.
4. THALBERG, Kyrre, Bjoern LINDMAN a Gunnar KARLSTROEM. Phase behavior of systems of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: influence of surfactant chain length and polyelectrolyte molecular weight. *The Journal of Physical Chemistry*. 1991, vol. 95, issue 8, s. 3370-3376. DOI: 10.1021/j100161a073.
5. THALBERG, Kyrre, Bjoern LINDMAN a Gunnar KARLSTROEM. Phase behavior of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: the effect of salt. *The Journal of Physical Chemistry*. 1991, vol. 95, issue 15, s. 6004–6011. DOI: 10.1021/j100168a053.
6. HALASOVÁ, T., J. KROUSKÁ, F. MRAVEC a M. PEKAŘ. Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2011, 2015-11-19, **391**(1-3): 25–31 [cit. 2015-11-19]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2011.05.035. ISSN 09277757.
7. YIN, Dian-shu, Wan-yun YANG, Zhi-qiang GE a Ying-jin YUAN. A fluorescence study of sodium hyaluronate/surfactant interactions in aqueous media. *Carbohydrate Research* [online]. 2005, 2015-11-19, **340**(6): 1201-1206 [cit. 2015-11-19]. DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.017. ISSN 00086215.
8. WEBER, Gregorio, M. SHINITZKY, A. C. DIANOUX a C. GITLER. Microviscosity and order in the hydrocarbon region of micelles and membranes determined with fluorescent probes. I. Synthetic micelles. *Biochemistry* [online]. 1971, 2015-11-19, **10**(11): 2106-2113 [cit. 2015-11-19]. DOI: 10.1021/bi00787a023. ISSN 0006-2960.
9. KOMAROMY-HILLER, Gabor a Ray VON WANDRUSZKA. Anisotropy Changes of a Fluorescent Probe during the Micellar Growth and Clouding of a Nonionic

- Detergent. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 1996, 2015-11-19, **177**(1): 156–161 [cit. 2015-11-19]. DOI: 10.1006/jcis.1996.0016. ISSN 00219797.
- 10. JOHANSSON, Lennart B. *Limiting fluorescence anisotropies of perylene and xanthene derivatives*. DOI: 10.1039/FT9908602103. ISBN 10.1039/ft9908602103. **a**
 - 11. BERLMAN, Isadore B. *Handbook of fluorescence spectra of aromatic molecules*. 2d ed. New York: Academic Press, 1971, xiv, 473 p. ISBN 01-209-2656-3. **b**
 - 12. SÁNCHEZ, F.García a C.Carnero RUIZ. Intramicellar energy transfer in aqueous CTAB solutions. *Journal of Luminescence* [online]. 1996, 2015-11-18, **69**(4): 179-186 [cit. 2015-11-18]. DOI: 10.1016/S0022-2313(96)00116-0. ISSN 00222313. **c**
 - 13. SZUBIAKOWSKI, Jacek, Aleksander BALTER, Wiesław NOWAK, Andrzej KOWALCZYK, Krzysztof WIŚNIEWSKI a Małgorzata WIERZBOWSKA. Anisotropic reorientation of perylene and 3,9-dibromoperylene in glycerol: fluorescence anisotropy decay and quantum-mechanical study. *Chemical Physics* [online]. 1996, 2015-11-18, **208**(2): 283-296 [cit. 2015-11-18]. DOI: 10.1016/0301-0104(96)00104-8. ISSN 03010104.
 - 14. SÁNCHEZ, F.García a C.Carnero RUIZ. Intramicellar energy transfer in aqueous CTAB solutions. *Journal of Luminescence* [online]. 1996, 2015-11-19, **69**(4): 179-186 [cit. 2015-11-19]. DOI: 10.1016/S0022-2313(96)00116-0. ISSN 00222313.

This work was supported by Materials Research Centre at FCH BUT-Sustainability and Development, REG LO1211, with financial support from National Programme for Sustainability I (Ministry of Education, Youth and Sports).

Determination of the Reference Genes in *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* for Real-Time PCR

*Radka Hrudíková
Stanislav Pepeliaev, Vladimír Velebný*

*Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Physical Chemistry
Purkyňova 464/118, Brno 612 00
xchrudikova@fch.vutbr.cz*

1 Introduction

Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus* (SEZ) is classified in Lancefield's group C and is a primarily opportunistic pathogen of a wide variety of domesticated species. The studied SEZ ATCC 35246 strain is the pathogen most commonly isolated from horses. Some of these strains are known as hyaluronic acid (HA) producers. Hyaluronic acid is an important biopolymer (polysaccharide) in vertebrates. Strains of streptococci are able to produce HA in the form of extracellular capsule as the one of the virulence factors. The investigation of SEZ gene expression provides opportunities to understand its pathogenesis mechanism (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3187426/>). Real-time polymerase chain reaction (rtPCR) has become the preferred method for studying gene expression [1]. The study of gene expression profiles is commonly performed by relying on cDNA microarray technique. However rtPCR often serves to validate the data obtained by other methods [2, 3]. It is considered to be the most sensitive, specific and fast allowing measurement of genes even with very low expression. [4, 3]. To reach its maximum analytical potential, it is necessary to introduce appropriate normalization and validation methods. [5, 3]. Key element of correct interpretation of rtPCR data is correct selection of the reference gene, i.e. such gene, which expresses steadily during the selected period of time.

2 Experimental

2.1 Materials and methods

Total RNA was isolated from the overnight culture of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* strain ATCC 35246 and CO4A with UltraClean® Microbial RNA Isolation Kit (MoBio). Samples were picked at four cultivation times (4 h, 8 h, 12 h, 16 h) in three biological replicates.

Quality and quantity of RNA were estimated by UV-VIS (Cary 50, Varian) and by analysis on Experion™ platform (BioRad). The cDNA was generated by High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies).

Ten genes with the most stable expressions were chosen based on data from the previous DNA array experiments (Table 1). The primers for rtPCR were designed in Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) with the following parameters: product size 50–150 bp, primer size 18–22 bp, melting temperature 58,5–61,5 °C, GC content 40–60 %, no primer secondary structures, no non-specific products.

Table 1: List of the potential reference genes and their function in the cell

Gene	Primer sequence (reverse/forward)	Function	Amplicon Tm [°C]	Amplicon length [bp]
SeseC_00096	TGGTTCACGCCCTGTCTTT GCTGGGCCAACCTCTTTAT	NUDIX hydrolase	78,14	80
SeseC_00097:ispE	GCTTGTCCCTCTGGGTGGTT ACCTGCCTCAATGGCTGAAA	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	77,99	131
SeseC_00549:lacB	AGTTTCTGGCATTCGCTCA CTCGCCTGTGATTTACCGC	galactose-6-phosphate isomerase subunit LacB	79,48	110
SeseC_00725:ileS	CGGTAACAGCTTCGTGGT CAGTCCTTCTGCCACCACAT	isoleucyl-tRNA synthetase	78,44	101
SeseC_00767	GAGCAGACAAGGCAGGAGTT AGGGTGCTCACCTCCACAT	transcriptional repressor	77,69	75
SeseC_00768	GCAGGGCTTGGTGTGATAA AGCTCAATACCAAGCCCTCCT	hypothetical protein	77,25	82
SeseC_02327:mscS	ACTCAAGTGCAGGCTTGA GCCGCCTGATTGTTGCTAA	mechanosensitive ion channel protein	75,90	81
SeseC_02508:mviM	CCCTCGATAAGCTCGAAGG CTACAGTCAGGTAGCAGGGC	oxidoreductase	78,29	96
SeseC_01348gyrA	GGTTTCAATCTCGGTGCGTG CCTTGGTGATGGGACGTTCA	DNA gyrase subunit A	77,09	89
SeseC_01041gyrB	TACTGCTATGGGGACAGGCT CCCCATCGACATCTGCATCA	DNA gyrase subunit B	78,73	95

Real-time PCR was performed in 8-tube strips on 96-well plate in volume of 10 µl. Power SYBR®Green PCR Master Mix kit (Life Technologies) was used. The amplification started with 10 minutes at 95 °C for AmpliTaq Gold® Polymerase activation followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 seconds and combined primer annealing/extension at 60 °C for 60 seconds (Table 2).

Table 2: Parameters of the rtPCR method

Stage	Temperature [°C]	Time [min]	Comments
Holding stage	95°C	10	Activation of the AmpliTaq Gold® DNA Polymerase
	95°C	15	Denaturation
Cycling stage	60°C	1	Annealing/Extending

All samples were analyzed in two technical replicates. The obtained data were processed and analyzed in ExpressionSuite Software (Life Technologies) and Excel (Microsoft) including Genorm add-on [6].

2.2 Results and discussion

The highly pure total RNA was isolated from SEZ samples in concentrations not less than 150 ng/ μ l. The A₂₆₀/A₂₈₀ ratios and the results from Experion™ analysis confirmed high quality of RNA and its applicability for further cDNA synthesis. According to the initial rtPCR optimization step the synthesized cDNA was subsequently diluted 500-fold to the final volume of 1000 μ l.

All primer pairs underwent melting temperature analysis for specificity determination. In all cases the melting curves had the same shape as shown on Figure 1 confirming high specificity of primers and absence of any secondary structures and non-specific products.

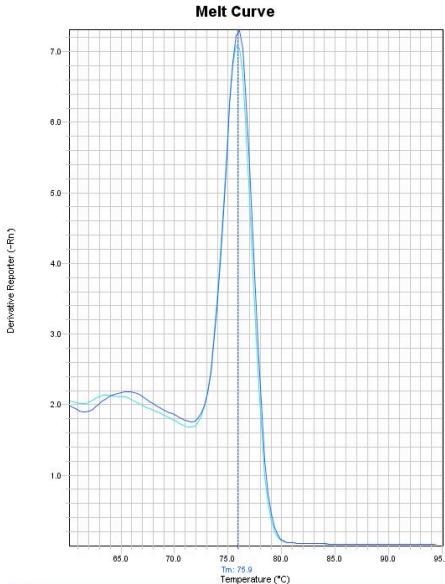


Figure 1: Melting curve of SeseC_02327:mscS gene rtPCR. The sample was taken at 4th hour of cultivation, two technical replicates were made. The shape of curve with only one peak confirmed the absence of primer dimers and secondary structures of primers or non-specific product. Axis X – temperature (°C), Axis Y – Derivative reporter (-Rn)

The reliability of data was also confirmed by great convergence of biological replicates, as it shown on Figure 2.

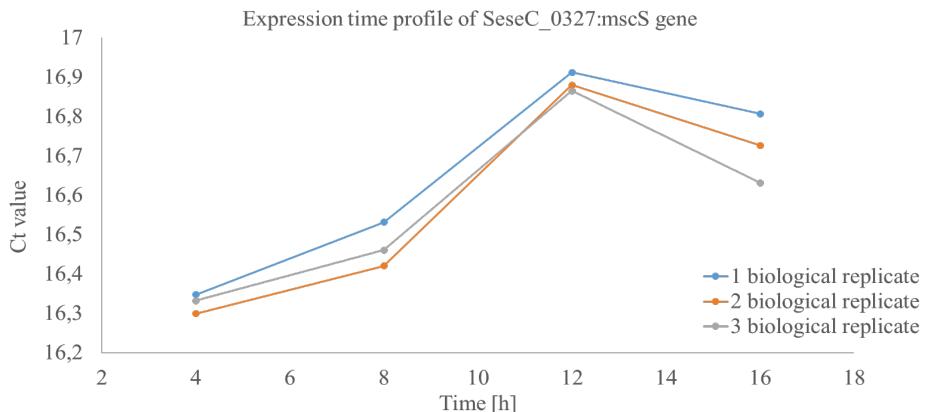


Figure 2: Expression time profile of SeseC_0327:mscS gene in three biological replicates. Samples were taken at 4h, 8h, 12h and 16h. Expression changes are similar in all three replicates.

The analysis of candidate genes expression in Excel resulted in the graph shown on the Figure 3. The constant value of expression level of potential reference gene (straight line, in other words) cannot be expected, mainly due to variance in sample preparation. Instead, the genes with the similar expression trend are looked for, as the steadily expressed genes should change similarly along the time. According to the Figure 3 those are SeseC_00097:ispE, SeseC_00767, SeseC_01348:gyrA and SeseC_02327:mscS.

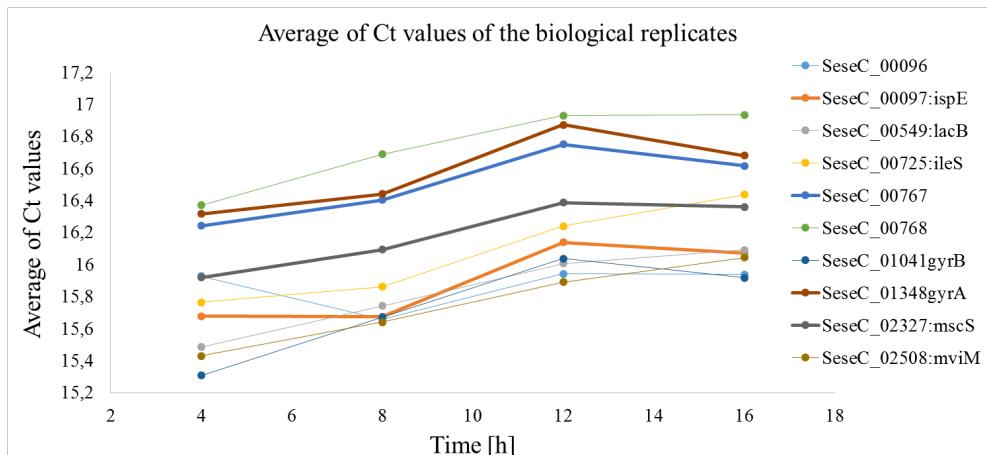


Figure 3: Expression time profiles studied genes. Samples were taken at 4h, 8h, 12h and 16h.

Additionally, the data obtained from rtPCR were processed in Genorm add-on, where expression variance is calculated. It is expressed by M value, which stands for average expression stability value. Lower M-value means more stable expression, higher M-value means less stable expression of the gene. According to the authors of this software, there is a threshold of this value for appropriate reference gene selection. If M is higher than 1.5, then the gene is not suitable to be a reference gene. The threshold could be user-determined for each application, but appears that M = 1.5 is the most appropriate in most cases. All candidate genes have extremely low M-value not exceeding 0.2 (figure 4). In fact, that means that all of them could be used as reference genes. Nevertheless, based on data both from Genorm and our own calculations and observations only three genes were selected as reference for our further studies: SeseC_02327 (*mscS*, NCBI gene ID 14004807), SeseC_00767 (NCBI gene ID 14003568), SeseC_01348 (*gyrA*, NCBI gene ID 14004035).

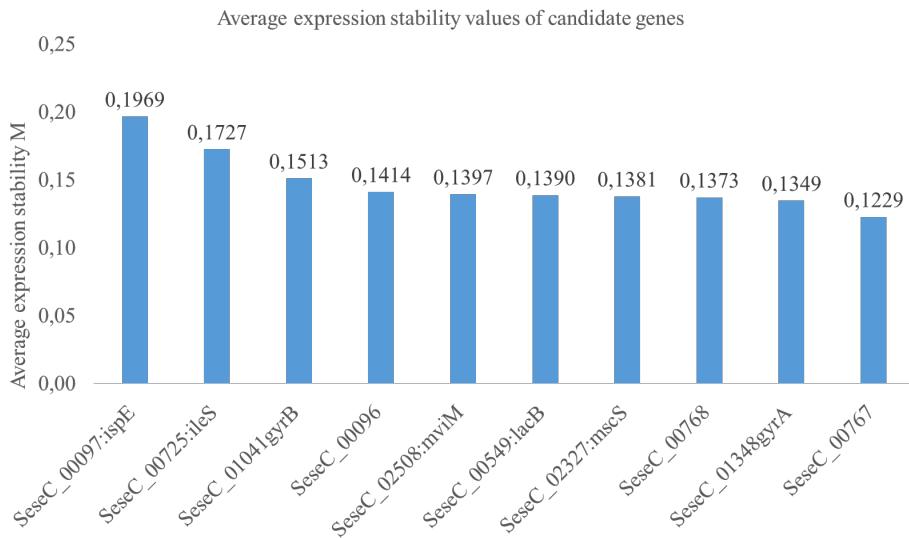


Figure 4: Average expression stability candidate genes.

3 Conclusion

Three potential reference genes have been determined: SeseC_02327 (*mscS*, NCBI gene ID 14004807), SeseC_00767 (NCBI gene ID 14003568), SeseC_01348 (*gyrA*, NCBI gene ID 14004035). We have chosen *gyrA* gene as reference for our further qPCR experiments with *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* strains ATCC 35246 and CO4A.

4 References

1. Bustin, S. A., 2004, A-Z of Quantitative PCR. IUL Press, San Diego, CA.
2. Mallona I, et al. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biology*. 2010.
3. Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*. 2013;54(4):391-406. doi:10.1007/s13353-013-0173-x.
4. Gutierrez, et al. Towards a Systematic Validation of References in Real-Time RT-PCR. *The Plant Cell*. 2008;20(7):1734-1735. doi:10.1105/tpc.108.059774.
5. Bustin, S A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. 2009.
6. T.D. Schmittgen et al., Analysing real-time PCR data by the comparative C_t method, *Nature Protocols*, 2008, doi: 10.1038/nprot.2008.73.

Comparison of magnetic nano- and microparticles application for DNA isolation from real samples

Jana Konečná¹, Alena Španová¹, Daniel Horák², Bohuslav Rittich¹

¹Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Department of Food Chemistry and Biotechnology, xckonecnaj@fch.vutbr.cz

²Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic

1 Introduction

In the past decade, magnetic nano- and microparticles have been widely employed for numerous biomedical and biological applications. The complexation of nano- and microparticles with DNA to form magnetoplexes is even more attractive in view of the potential applications in gene magnetofection, DNA isolation and bio – analysis. When the surface is modified with positively charged ligands, nano- and microparticles can adsorb negatively charged nucleic acids through electrostatic interactions.¹ The polymerase chain reaction (PCR) has become an essential and indispensable tool for biological research and laboratory diagnostic applications². However, numerous substances have been demonstrated to inhibit PCR³. Although a wide range of inhibitors is reported, the mechanisms and ways of action of many remain unclear⁴. The inhibitors generally make cause at one or more essential ways: (1) interfere with the cell lysis, which influences DNA extraction; (2) interfere by nucleic acid degradation; (3) inhibit polymerase activity. The problem of pure DNA (PCR-ready DNA) isolation can be resolved by means of various isolation and purification techniques⁵.

The aim of this work was to compare the application of magnetic poly (L-lysine) (PLL) modified iron oxide nanoparticles and hydrophilic magnetic non-porous poly(2-hydroxyethyl methacrylate-*co*-glycidyl methacrylate) - P(HEMA-*co*-GMA) microspheres for DNA isolation from food supplements.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

DNA isolated from bacterial cells of Lactobacillus gasseri K7 from Collection of microorganisms, Chair of Dairy Science, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Slovenia. Agarose was purchased from Top-Bio (Prague, Czech Republic), ethidium

bromide from Sigma (St. Louis, USA). The PCR primers were synthesized by Generi Biotech (Hradec Králové, Czech Republic), Taq1.1. polymerase was from Top-Bio (Prague, Czech Republic). The DNA marker (100 bp ladder) for gel electrophoresis was from Malamit  (Moravsk  Prusy, Czech Republic). Magnetic P(HEMA-co-GMA) and poly (L-lysine) (PLL) modified iron oxide nanoparticles were prepared using methods published earlier^{6, 7}. Specification of probiotic food supplements and magnetic particles are shown in Table 1 and Table 2, respectively. The other common chemicals and solvents were of analytical grade.

Table 1: Specification of food supplements

Supplement	Microorganisms	Declared cfu/capsule	Auxiliary compounds	Form
Linex® Forte	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-5), <i>Bifidobacterium animalis</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i>	2×10^9	dextrose, inulin, microcrystalic cellulose oligosacharids, magnesium stearate	capsule
Pangamin	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	–	milk, soluble fibre,inulin, evening primrose oil	tablete
Lactobacily Forte	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>B. infantis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>B. longum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>B. breve</i>	10×10^9	Maltodextrine, fructooligosacharids, gelatin, magnesium stearate, ascorbic acid	capsule
Lactomax	<i>L.acidophilus</i> , <i>L.bifidus</i> , <i>L.bulgaricus</i> , <i>L.caucasicus</i> , <i>L.rhamnosus</i>	10×10^9	Niacin, vitamine B6, riboflavin, thiamine	capsule

Table 2: Specification of magnetic microparticles

Magnetic particles	Fe (%)	Dn	-NH ₂ (mM/g)	PDI
P(HEMA-co- GMA)	11	1.27 µm	1.79	1.04
F79/L3-PLL	69.8	6.2 nm	0.28	1.37

Dn – number average particle diameter, PDI-polydispersity index (ratio of weight- to number-average particle diameter)

2.2 Equipment

Spectrophotometric measurements of DNA were carried out on a UV spectrophotometer NanoDrop ND-2000/2000c (Thermo Scientific, Wilmington, USA). Magnetic particles were separated using an InvitrogenTM magnetic particle concentrator (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway). The DNA in PCR mixtures was amplified in an Termocycler PTC-200 (BIO-RAD Laboratories, Richmond, USA). Agarose gel

electrophoresis was carried out using equipment for electrophoresis Owl Easy-cast, model B1 (Thermo Scientific, Wilmington, USA), source voltage Enduro Power supplies, model E0303 (Labnet International, New York, USA). PCR products were visualised on a UV transilluminator TVR 3121 (Spectroline, Paramount, USA).

2.3 DNA isolation from food samples

Content of 1 capsule of food supplements or cells from 1 ml culture were washed and resuspended in 1.5 ml of lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 5 mM EDTA, pH 8.0, lysozyme 5 mg × ml⁻¹), for 1 hour. Crude cell lysates were prepared using 12.5 µl of 20% SDS, 10 µl of proteinase K (1 mg/ml) and incubation at 55 °C for 3 hours.

DNA was extracted from the crude cell lysates of food products using next procedures, briefly: a total 100 µl of crude cell lysate,

- a. 50 µl poly (L-lysine) (PLL) modified iron oxide nanoparticles (0.1 mg × ml⁻¹), 100 µl phosphate buffer (0.067 mol×l⁻¹ KH₂PO₄, 0.067 mol×l⁻¹ Na₂HPO₄•2H₂O, pH 7.6) or 400 µl 40 % PEG 6000, 400 µl 5 M NaCl (end concentration 16 % PEG 6000 and 2.0 M NaCl) and 50 µl of sterile water.
- b. P(HEMA-co-GMA) (2 mg × ml⁻¹), 400 µl 40 % PEG 6000, 400 µl 5 M NaCl PEG 6000 and 2.0 M NaCl) and 50 µl of sterile water.

Mixtures were incubated for 15 min at laboratory temperature. The DNA captured to the microspheres was washed by 1000 µl and 300 µl of 70% ethanol and eluted, phosphate buffer (pH 8) for 30 min, TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.8) ,or TE buffer with 10mM KCl (pH 9) at 90 °C in the case of poly (L-lysine) (PLL) nanoparticles or 50 µl of TE buffer the case of P(HEMA-co-GMA) (2 mg × ml⁻¹), microspheres. The concentration of isolated DNA was estimated spectrophotometrically. Conventional phenol extraction procedure was used as control. Quality of extracted DNA was checked spectrophotometrically, agarose gel electrophoresis and by PCR.

2.4 PCR amplification and detection of PCR products

Bacterial DNA eluted from magnetic microparticles (1 µl) was used as DNA matrix in PCR. PCR was performed using F eub a R eub primers specific to the domain *Bacteria*⁹, (466 bp long DNAamplicons). Typically, the PCR mixture contained 1 µl of each 10 mM dNTP, 1 µl (10 pmol × µl⁻¹) of each primer, 1 µl of DNA matrix, and 1 µl of Taq 1.1 polymerase (1 U × µl⁻¹), 2.5 µl of buffer, and PCR water was added to a final 25 µl volume. After 5 min of the initial denaturation period at 94 °C, amplification was carried out in 30 cycles of 30 s at 94 °C; 30 s at 55 °C, and 60 s at 72 °C. In the last cycle, the elongation step at 72 °C was prolonged to 10 min. PCR products were separated using agarose gel electrophoresis on 1.5% agarose gel in TBE buffer (45 mM boric acid, 45 mM Tris-base, 1 mM EDTA, pH 8.0). DNA was stained using ethidium bromide (0.5 µg × ml⁻¹).

3 Results and discussion

Tested particles were applied for DNA isolation from following food supplements: Linex forte, Laktobacily forte, Pangamin and Lactomax (Table 2). Selected food supplements are complex matrices containing inhibitors (colorants, cellulose, Ca^{2+} ions etc.)⁴ which can interfere in polymerase chain reaction. The amounts of DNA isolated from the real samples are given in Table 3. From presented results it follows, that P(HEMA-co-GMA) particles provide the highest yields of the isolated DNA compared with nanoparticles covered by PLL. TE buffer, TE buffer containing KCl and phosphate buffer were tested for DNA elution. The highest amounts of isolated DNA were found if TE buffer with KCl was used as elution agent in the case of PPL magnetic nanoparticles.

Table 3: The amount of isolated DNA ($\text{ng} \times \mu\text{l}^{-1}$) from real samples by tested methods

Method	Phenol extraction	P(HEMA-co-GMA)	Nanoparticles covered by PLL/adsorption/elution mixture (buffer)					
			PEG 6000/NaCl	PEG 6000/NaCl			Phosphate	
Supplements		TE	TE	TE + KCl	Phosp hate	TE	TE + KCl	Phosp hate
Linex Forte	92.9	41.5	15.5	25.0	14.1	4.8	10.9t	14.2
Lactobacily Forte	43.4	34.8	5.0	19.4	6.6	3.2	10.7	7.7
Pangamin	97.6	63.5	17.7	18.6	23.5	5.2	19.0	7.3
Lactomax	95.3	38.7	8.3	16.8	9.7	11.8	20.7	18.2

The composition of adsorption/elution mixtures are given in chapter 2.3.

The quality of the eluted DNA from real complex samples was verified by PCR with primers specific for the domain *Bacteria*. The specific PCR products 466 bp size (domain *Bacteria*) were detected in all samples. Different intensity of detected amplicons coincides with different amount of eluted DNA from the real samples. The quantity and quality of DNA corresponds the requirements PCR amplification. The detection results of the PCR product are shown in Figure 1 and Figure 2.

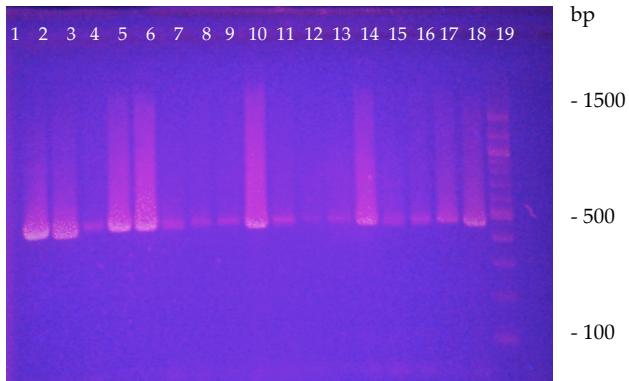
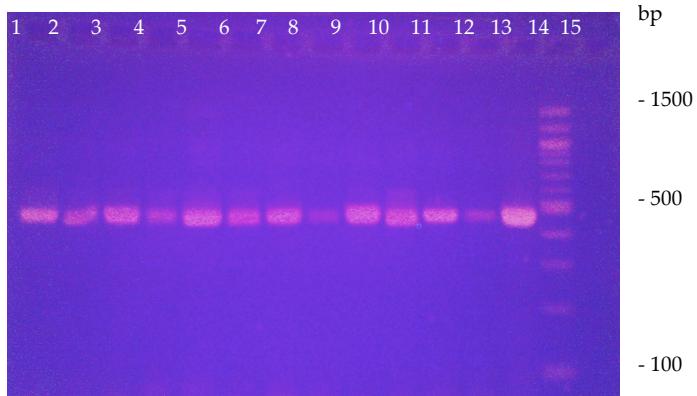


Figure 1: Agarose gel electrophoresis of PCR products obtained after amplification of DNA isolated from probiotic food supplements using magnetic microparticles P(HEMA-co-GMA) and nanoparticles PLL using PEG/NaCl. Lanes 1–4: DNA isolated using P(HEMA-co-GMA): (1) – Linex® Forte, (2) – Lactobacily forte, (3) – Pangamin, (4) – Lactomax; Lanes 5 – 8: DNA isolated using PLL (TE buffer) (5) – Linex® Forte, (6) – Lactobacily forte, (7) – Pangamin, (8) – Lactomax; Lanes 9–12: DNA isolated using PLL (TE buffer + KCl) (9) – Linex® Forte, (10) – Lactobacily forte, (11) – Pangamin, (12) – Lactomax; Lanes 13–16: DNA isolated using PLL (Phosphate buffer) (13) – Linex® Forte, (14) – Lactobacily forte, (15) – Pangamin, (16) – Lactomax; lane 17: positive control; lane 18: DNA standard; lane 19: negative control



*Figure 2: Agarose gel electrophoresis of PCR products obtained after amplification of DNA isolated from probiotic food supplements using magnetic nanoparticles PLL using phosphate buffer. Lanes 1 – 4 TE buffer: (1) – Linex® Forte, (2) – Lactobacily forte, (3) – Pangamin, (4) – Lactomax; Lanes 5–8: (TE buffer + KCl) (5) – Linex® Forte, (6) – Lactobacily forte, (7) – Pangamin, (8) – Lactomax; Lanes 9–12 Phosphate buffer: (9) – Linex® Forte, (10) – Lactobacily forte, (11) – Pangamin, (12) – Lactomax; lane 13: positive control DNA (*L. gasseri* K7); lane 14: DNA standard; lane 15: negative control*

4 Conclusion

It was shown that the DNAs isolated from food supplements using tested magnetic particles were in PCR-ready quality and could be used for conventional PCR applications.

The financial support of internal grant FCH-S-15-2827 is gratefully acknowledged.

5 References

1. SHAN, Zhi, et al. Promoting DNA loading on magnetic nanoparticles using a DNA condensation strategy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, 125: 247-254.
2. RUDI, K., et al. Rapid, universal method to isolate PCR-ready DNA using magnetic beads. *BioTechniques*, 1997, 22.3: 506-511.
3. KEMP, Brian M.; MONROE, Cara; SMITH, David Glenn. Repeat silica extraction: a simple technique for the removal of PCR inhibitors from DNA extracts. *Journal of archaeological science*, 2006, 33.12: 1680-1689.
4. WILSON, Ian G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and environmental microbiology*, 1997, 63.10: 3741.
5. TRACHTOVÁ, Štěpánka, et al. The Evaluation of Magnetic Polymethacrylate-based Microspheres Used for Solid Phase DNA Micro-Extraction. *Chromatography*, 2015, 2.2: 156-166....
6. RITTICH, Bohuslav, et al. Separation of PCR-ready DNA from dairy products using magnetic hydrophilic microspheres and poly (ethylene glycol)-NaCl water solutions. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2009, 321.10: 1667-1670.
7. BABIC, Michal, et al. Poly (L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjugate chemistry*, 2008, 19.3: 740-750.
8. SAMBROOK, J.; RUSSELL, David W. Molecular cloning. A laboratory manual. Third. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*, 2001.
9. HAARMAN, Monique; KNOL, Jan. Quantitative real-time PCR analysis of fecal Lactobacillus species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied and environmental microbiology*, 2006, 72.4: 2359-2365.

Study of morphology the isolated cuticle from *Prunus laurocerasus*

Marcela Laštůvková

Petr Sedláček, Jiří Smilek, Martina Klučáková

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Physical Chemistry

Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic

xclastuvkova@fch.vutbr.cz

1 Introduction

Despite the negative perception of the community, pesticides are still going to be used for many decades to ensure the food supply for the ever growing world population. One of the most important ways how to improve the efficiency of pesticides and minimize their impact on off-target living systems is through increasing the penetration of active ingredients into plant foliage¹.

The absorption of minerals by leaves of plants was demonstrated experimentally 100 years ago^{2,3}. The numerous works studied the uptake of mineral ions, fungicides, pesticides, etc. Root absorptions of nutrients were replaced by foliar fertilizers, which became the new method of absorption of the plant beneficial substances. Absorption by living folic cells of any foliar applied chemical (mineral nutrients, growth regulators, pesticides, antibiotics) must be proceeding by transcuticular penetration⁴.

For these studies they use top and/or bottom part from the plant leaves – cuticles. It is the first barrier with many important functions (respiration, regulation of water, regulation of ions, penetration of nutrients, etc.). The permeability of the cuticle membrane for ions, herbicides, and pesticides has been discussed in several papers⁵⁻⁷. The foliar uptake of active ingredients is a complex process and depends on the leaf surface of plant, physicochemical properties of the chemicals structure or properties of cuticles¹. An important role for the nutrient absorption plays the concentration of the additives as well as the environmental conditions. Wang and Liu¹ summarized the major progress of the foliar fertilization especially during the last 15 years. They wanted to clarify the pesticide uptake into plant foliage and influence of adjuvants¹.

The cuticles were obtained by two isolation methods – chemical and enzymatic methods. Enzymatically isolation methods (EIM) were demonstrated by Chayen⁸ and Hohl⁹, who used pectin enzymes as the macerating agents in anatomical and cytological studies. Orgel¹⁰ tried to develop a simplified cuticle isolation procedure, which is based on the usage of commercially available pectin enzymes. Chemically isolation methods (CHIM) were demonstrated by Holloway and Baker¹¹, who used zinc chloride-hydrochloric acid solution. Edgington¹² was inspirited by this isolation method and he used isolated cuticles for his transcuticular movement of fungicides.

Our work is focused on the study of the cuticle morphology and their utilization for diffusion experiments. For these experiments, we used leaves of *Prunus laurocerasus*, which were characterized as strong and rigid. Results presented in this paper open the new view on the compounds penetration through plant cuticles and their usage for commercial application.

2 Experimental

2.1 Material

For this work was used following materials.

Enzymatically isolated plant cuticles:

- Citric buffer (citric acids, sodium citrate),
- Enzymes (pectinase, cellulose),
- Disinfections (sodium aside).

These materials were purchased from Sigma-Aldrich (Germany).

We stripped the rims from leaves of *Prunus laurocerasus* and prepared leaves were given into the square container with cover and volume 500 ml. These leaves were fixed by grid, to avoid floating to the surface of leaves. The fixed leaves were covered by 60 wt. % zinc chloride ($ZnCl_2$) dissolved in 35 wt. % hydrochloric acid (HCl). The container was covered, to avoid evaporation of solution and it was maintained at 25 °C. After 2 days leaves were transferred into the container with the distilled water for rinsing. After that cuticles were prepared for characterization.

Chemically isolated plant cuticles:

- Zinc chloride,
- Hydrochloric acids.

These materials were purchased from Sigma-Aldrich (Germany).

We stripped the rime from leaves of *Prunus laurocerasus* and prepared leaves were given into the container again. The leaves were fixed by grid, to avoid floating to the surface of leaves. This method is based on the 0.1 M citrate buffer solution by pH 3.5–4.5 and concentration of pectinase and cellulose enzymes was 5 wt. %. Then, sodium azide was added to the buffer solution in the container as disinfection agent. The container was covered, to avoid evaporation of solution and it was maintained at 25 °C for 7 weeks. Then the cuticles were washed gently by distilled water. The cuticles were prepared for the characterization.

Further study materials:

- Potassium lignohumate.

These material was received from Amagro s.r.o.

2.2 Methods

Measuring of Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

Isolated plant cuticles were cut on the squares (1.5×1.5 cm) and those were placed on microslides and they were covered by glass slide. Prepared samples were used for measuring by FLIM and the study of fluorescence lifetime groups present on plant cuticles. Cuticles were studied at different conditions – air, water and 0.5 wt. % LHA. Samples were measured at specified intervals – day after isolation, 1 to 3 days effect of LHA and after 11 days effect of LHA). This method was used for assessment of the stability of cuticles at different conditions and their abilities of interaction with LHA.

Measuring of Isothermal Microcalorimetry

Isolated plant cuticles were used for studies of interaction between substances (air, water and LHA) and cuticles. For these experiments, wet or dried cuticles were used. First experiment was based on fresh isolated cuticles, which were placed in ampoules with different conditions (air, water and 1 wt. % LHA). This experiment showed that cuticles and LHA interact together (pilot measurement).

The second experiment was based on dried cuticles, which were dried at 30°C for 24 hours. These cuticles were placed in 4 ml measuring ampoules, which were filled with different concentrations of LHA solution (1 wt. %, 0.5 wt. % and 0.1 wt. %). The third experiment was based on study of clear condition. The ampoules contained water, 1 wt. % LHA and 0.5 wt. % LHA.

First two experiments served for studies of interactions between different conditions and wet/dried cuticles. The last experiment enables to clarify, that LHA is suitable matters for this research and where it has not impact on measurements. Experiments were performed measured at 25°C .

Measuring of Optical and Fluorescence Microscopy

Optical microscopy is a simple technique for studying the structure of the thin layers for study of structure of thin layers and their partition on top and bottom cuticles. Optical microscopy enables the first observation of cuticle state and its conditions for the following experiments. The cuticles were placed on the microglass and they were covered by the microslide. The experiments were performed with fresh cuticles and cuticles, which were exposed to 0.5 wt. % solution of LHA for 1, 2, 3 and 11 days respectively.

The fluorescence microscopy is a method used for the study of cuticle structure. The important thing is that fluorescence of cuticles is spontaneous without usage of any common fluorescent. This characterization can be used for elementary research. Leaves used for diffusion processes cause changes of emission light by compounds present in cuticles and enable to determine depth of penetration of chosen materials.

Experiment for optical microscopy was based on the fresh isolated cuticles which they were exposed to water and air. For fluorescence microscopy we used the whole leaves which were placed in water solution 1 wt. % LHA.

3. Results

Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

This method studied fluorescence lifetime of groups present on cuticles. From obtained data, the average values were determined for measured time and also the deviation. Graph (Fig. 1) shows stability of cuticles under air condition. They have the same behaviors after 11 days in the present environment. This is very important fact for further experiments.

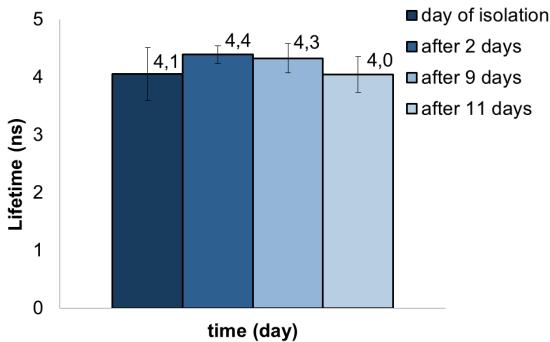


Fig. 1: Lifetime of fluorescence groups under air condition.

Water is a natural environment for the cuticles, but we would like to know, how isolated cuticles behave under this condition and if there is no degradation in time or if there is any influence on properties of cuticles.

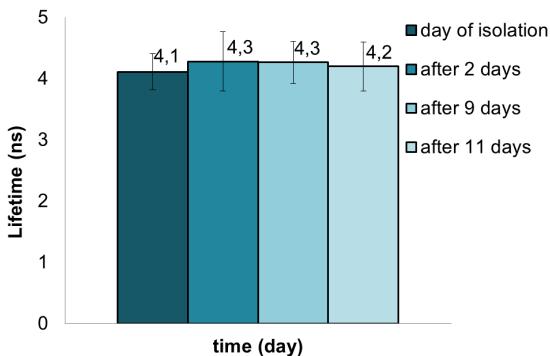


Fig. 2: Lifetime of fluorescence groups in water condition.

From Fig. 2, it is obvious, that there is no change of fluorescent lifetime of cuticles in time. It can be seen that there is no degradation after 11 days and it is possible to use them for diffusion experiments. Moreover, we can show that the data for air and water

conditions are very similar, also cuticles are stable in this environment and we can use this material for the transport experiments.

The last graph (Fig. 3) shows cuticles under LHA conditions after 11 days. There is an exponential decrease of fluorescence lifetime. From data we can show exponential decrease of fluorescence lifetime groups in cuticles in measured time. From the graph is possible conclude the positive interaction between potassium lignohumate and cuticles. It is possible to conclude that there is interaction between K-LH and cuticles. The knowledge of fluorescence life time can help us to understand foliar uptake of fertilizers.

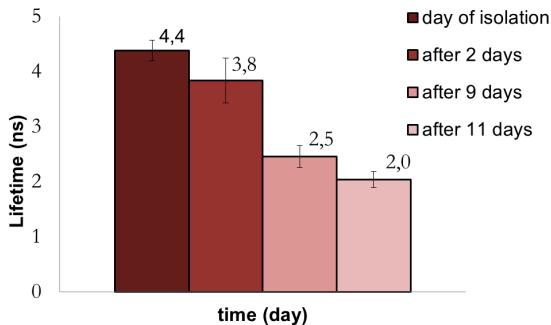


Fig. 3: Lifetime of fluorescence groups in LHA condition.

Isothermal Microcalorimetry

This method serves as a comparison to FLIM measurement. The first measurement was the one, where cuticles with air and water do not react (constant line), but cuticles under 1 wt. % LHA condition showed increasing heat flow, also we can deduce specific interactions between the investigated materials. It brought the idea for further experiment (Fig. 4). The cuticles were put into the ampoules and the ampoules were then filled with water and different LHA solutions (1, 0.1 and 0.05 wt. %).

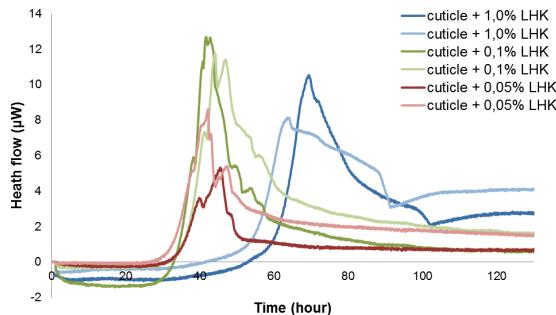


Fig. 4: Isothermal microcalorimetry – cuticles and different concentration of LHA (1 wt. %, 0.1 wt. % and 0.05 wt. %).

Moreover, the important finding is the time of the interaction, which it is in range 42 to 70 hours. This fact explained the ability of cuticles uptake.

Optical and Fluorescence Microscopy

The optical microscopy was used for assessment top or bottom cuticles (Fig. 5) and for studies of their structure or possible changes in the structure of cuticles by using LHA. For chemically isolated cuticles were made same images. Used method is not so useful for the determination of changes in structure of cuticles using LHA.

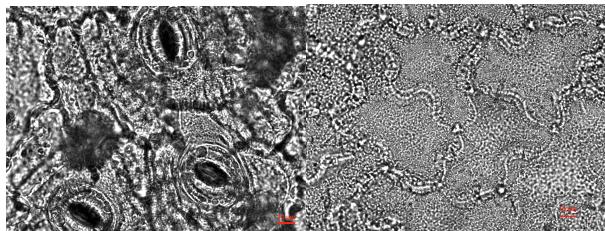


Fig. 5: Bottom cuticle (left) and top cuticle (right) for EIC.

Fluorescence microscopy (Fig. 6) enabled to establish spontaneous fluorescence of cuticle or the whole leaves, which is possible by the nutrients uptake. Leaves were placed into the container with 1 wt. % LHA. From measurement were detected the fluorescence change on the cuticles in the time. Also, we can revealed, positive interaction between LHA and cuticles.

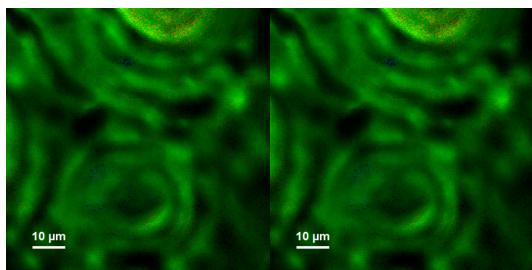


Fig. 6: Bottom EIC – change of fluorescence lifetime degradability in time (1, 2 and 3 days).

4 Conclusions

This work is focused on the morphology of the cuticles and their usage by foliar uptake. For this purpose, several methods were used. FLIM is the method, which it revealed establish LHA interactions with the cuticles. The results from FLIM measurements were correlated with the data obtained from microcalorimetry, which acknowledged the binding between the cuticles and LHA and moreover, it completed the

start of substance penetration, which was used by diffusion experiments. For the first characterization optical and fluorescence microscopy were used. Optical microscopy is a suitable method for disaggregation the cuticles on top/bottom of leaves. Fluorescence microscopy was used for observation of the uptake of LHA and clarification of spontaneous fluorescence, which can be used in following experiments. The results obtained from this work will be used for future experiments, which focus on the plant uptake of nutrients.

5 References

1. WANG, C. J., LIU Z. Q.: Foliar uptake of pesticides – Present states and future challenge. *Pestc. Bio. And Physiol.* 2007, r. 87, s. 1–8. DOI: 10.1016/j.pestbp.2006.04.004.
2. WITTWER, S. H., TEUBNER, F. G.: Foliar absorption of mineral nutrients. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1959, r. 10, s. 13–32. DOI: 10.1007/978-3-7091-8220-8_10.
3. YAMADA, Y., WITTWER, S. H., BUKOVAC, J.: Penetration of Ions through Isolated Cuticles. *Plant Physiol.* 1964, r. 39, s. 978–82. DOI: 10.1007/BF02411572.
4. WITTWER, S. H.: Foliar absorption of mineral nutrients. *Plant Sci.* 1964, r. 8, s. 161–82.
5. OKUDA, A., YAMADA, Y.: Studies on the permeability of cuticular membranes to radioactive cations and anions. *Proc. Japan Conf. on Radioisotopes.* 1962, r. 4, s. 1083–90. DOI: 10.1080/07352680902743069.
6. SCHIEFERSTEIN, R. H., LOOMIS, W. E.: Development of the cuticular layer in angiosperm leaves. *Amer. J. Botany.* 1959, r. 46, s. 625–35.
7. SKOSS, J. D.: Structure and composition as plant cuticle in relation to environmental factors and permeability. *Botan. Gaz.* 1955, r. 117, s. 55–72. DOI: 10.1146/annurev.pp.04.060153.001345.
8. CHAYEN, J.: Squash preparations of living root tip cells. *Nature.* 1940, r. 164, s. 930.
9. HOHL, L. A.: Application of pectic enzymes to maceration of plant tissues for microscopic study. *Stain Technol.* 1948, r. 23, s. 129–131.
10. ORGEL, W. H.: The isolation of plant cuticle with pectic enzymes. *Plant Physiol.* 1954, r. 27, s. 78–80. DOI: 10.1104/pp.30.1.78.
11. HOLLOWAY, P. J., BAKER, E. A.: Isolation of plant cuticles with zinc chloride-hydrochloric acid solution. *Plant Physiol.* 1968, r. 43, 1878–1879. DOI: 10.1104/pp.43.11.1878.
12. SOLEL, Z., EDGINGTON, L. V.: Bioassay and Transcuticular movement of fungicides. *Phytopathology.* 1972, r. 63, s. 505–510. DOI: 10.1002/ps.2780040517.

This work has been supported by Materials Research Centre at Faculty of Chemistry, Brno University of Technology – Sustainability and Development, REG Lo1211, with financial support from National Program for Sustainability I (Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic).

The utilization of freeze-drying method for solubilization of hydrophobes in the hydrophilic biopolymer environment

Petra Michalíková

Filip Mravec, Miloslav Pekař

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Materials Research Centre
Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic
xcmichalikova@ch.vutbr.cz

1 Introduction

Hyaluronan is a biopolymer characterized as essential for living organisms of various complexity (microorganisms or vertebrates). It is a linear biopolysaccharide composed of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine linked by a β -1,4 glycosidic bond (Figure 1)^{1,2}.

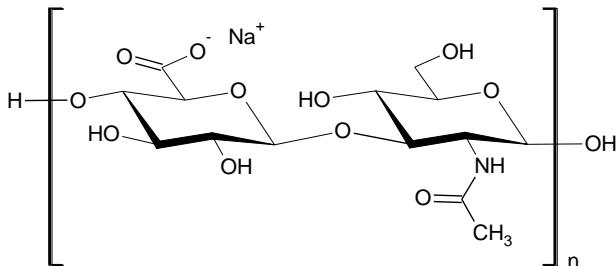


Figure 1: Structure of hyaluronan biopolymer

It is a part of the extracellular matrix in tissues and also a major component of a variety of other tissues. In the organism it has mechanical functions but it is important for many biological processes too². One typical example is its contribution to the proliferation of tumour cells. Therefore, many studies involve drug delivery system with hyaluronan as a carrier³⁻⁵. The majority of already utilized or potential drugs have a hydrophobic character. In contrast, hyaluronan is a highly hydrophilic polymer. Due to this fact hyaluronan does not interact with these chemicals without additional support.

Generally two strategies are used to tackle the problem – to prepare a modified hyaluronan or hyaluronan-drug conjugate⁶. Chemical modification can affect the biological functions and biocompatibility of hyaluronan. An alternative is to use hyaluronan-surfactant complexes formed by physical (electrostatic and hydrophobic)

interactions. However, due to the negative charge of hyaluronan, cationic surfactants should be used which have general cytotoxic effects though somewhat moderated in the presence of hyaluronan^{7,8}.

Literature discusses the existence of "hydrophobic patches" on the hyaluronan chain⁹. These areas could be used to bind non-polar substances directly onto the native hyaluronan chain. Hyaluronan as is described widely in literature^{10, 11} has on the other side a thick hydration layer. This results in protection of the hydrophobic areas against binding of non-polar compounds. Therefore, desired interactions must be supported by opening this shell. For these purposes the freeze-drying method was utilized as a way to remove the hydration layer and make the binding sites available.

2 Experimental

The process of freeze-drying runs at laboratory temperature and low pressure. Individual components are solubilized in a solvent and the sample is frozen. Subsequently, after the freezing is complete, the sample is heated at low pressure and the solvent is sublimated¹². In our case the widely used non-aqueous co-solvent medium (tert-butanol) was used in the combination with water^{13, 14}. This co-solvent was used to support the dissolving of hydrophobic substances and with process of drying also.

Hydrophobic polarity-sensitive fluorescence probes were used as hydrophobic models or indicators of interactions with hydrophobic hyaluronan patches. Perylene and prodan were selected for these purposes. By monitoring of their specific fluorescence parameters the presence of desired interactions was judged. The fluorescence parameters were studied by steady state fluorescence spectrometry.

Perylene is a strongly hydrophobic fluorophore, which does not dissolve in polar solutions at all and perylene in water does not provide fluorescence signal¹⁵. Therefore, the polarity of the environment was monitored by the intensity of fluorescence. Prodan, on the other hand, dissolves in solutions with broad range of polarities. It responds to solvent polarity by shifting the wavelength of the maximum peak¹⁵. From numbers of peak and theirs positions of maximum we judged the effectiveness of freeze drying method on the formation of the interactions in studied system.

Hyaluronan used in this work had molecular weights 106 kDa. Concentration of hyaluronan was 1 g dm^{-3} and the concentration of probes was $5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. All freeze-dried samples were compared with blank samples which were not treated by freeze-drying.

2.1 Fluorescence spectroscopy

The obtained emission spectra of dried and blank samples are shown in Figure 2 and 3. In the case of perylene (Figure 2), the monitored parameter was the fluorescence intensity. As we expected the fluorescence curve for blank had almost zero intensity of signal. That demonstrated insolubility of this probe in polar environments like aqueous solutions of hyaluronan. After freeze-drying, the signal increased rapidly due to interactions between perylene and hydrophobic patches on the hyaluronan molecule.

When the solvent was removed by freeze-drying, the hydrophobic patches were achievable for the probe.

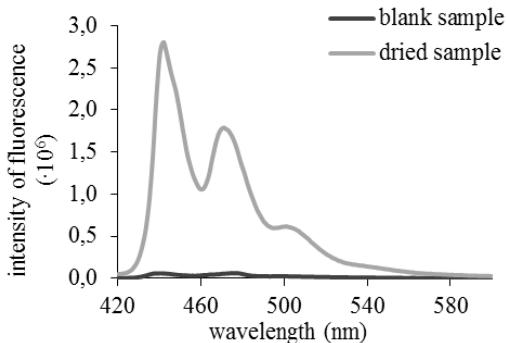


Figure 2: Normalized emission spectra of blank and dried samples with perylene and hyaluronan with molecular weight 106 kDa

The second studied fluorescence probe was prodan (Figure 2). The results show that the signals from blank samples were provided only by water. This is obvious from the obtained spectrum, which contains only one peak with a maximum at 519 nm (in the literature¹⁵ 520 nm is reported). Freeze-drying of the samples led to changes in all measured prodan spectra. Subsequently, the emission response had two maxima, and the final curve was the sum of the individual contributions of prodan molecules in environments of different polarity. Due to the summing of the contributions, the “water peak” was shifted to a wavelength around 513 nm. The second peak was at significantly lower wavelengths, as is common in more hydrophobic solvents. Therefore, we suppose that even in these samples interactions between the hydrophobic probe and the hyaluronic chain were successfully supported.

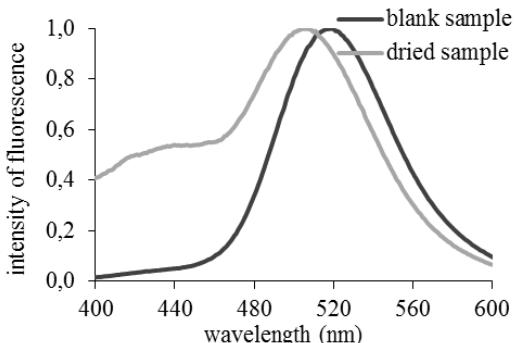


Figure 3: Normalized emission spectra of blank and dried samples with prodan and hyaluronan with molecular weight 106 kDa

This support of interactions was studied for other probes (pyrene and 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien), different molecular weight of hyaluronan (420 kDa and 1.46 MDa), different concentration of hyaluronan (0.1 g dm^{-3}) and for other biopolymers also (sodium alginate and carboxymethyl cellulose). In all cases we observed successfully supported interactions.

2.2 Residual among of tert-butanol

During the preparation of samples for freeze-drying tert-butanol (TBA) was introduced as co-solvent. TBA helped with dissolution of hydrophobic probe and homogenization of the sample before drying. This co-solvent could dissolve both probes because it has hydrophobic character and miscible with water. When no TBA was present, the resulting spectra of dried samples were close to those of blank samples. Thus, the presence of TBA was essential for the solubilisation of the probes during the preparation of the samples for freeze-drying.

Moreover TBA has also hydrophobic character. THIS could cause difficulties if it stays in some residual amount. It could distort the information from fluorescence measurements. Therefore, the residual amount of TBA was determined by a commercial laboratory in dried samples using head-space gas chromatography with FID detection.

The residual contents of TBA in dried samples ranged between 0.6–1 % (vol.). This amount of residual TBA is so low, that it cannot affect the fluorescence results. As you can see on Figure 4, the fluorescence intensity of perylene, the high hydrophobic probe, in TBA-water solutions is much lower in comparison with our freeze-dried samples. Intensity measured for dried samples would correspond to aqueous solutions containing at least 12–16 % of TBA. That indicates the freeze-drying process should be optimized.

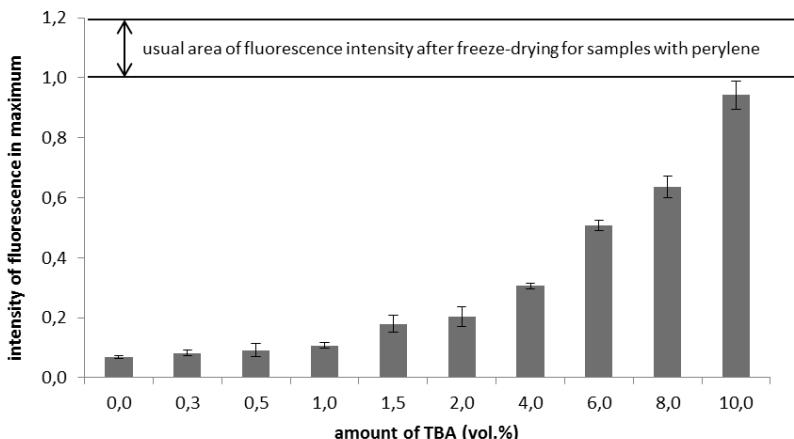


Figure 4: Perylene fluorescence intensity in water-TBA solutions of different composition. The intensity was normalized to the lowest value measured for dried samples under the same conditions

4 Conclusions

The results of this work show that the method of freeze-drying can be considered as a technique for supporting interactions between native hydrophilic biopolymer hyaluronan and hydrophobic species. Two fluorescence probes were used to indicate the efficiency of the creation of such interactions – perylene and prodan. Each probe exhibits specific behavior dependent on the character of the microenvironment in which it is dissolved. In this work, the most important parameter was the polarity of this microenvironment.

The steady state fluorescence spectrometry was used in present work as a main measuring method. Emissions of probes from polar surroundings indicated no interactions between the studied components of the systems. On the other hand, when the fluorescence corresponded to a nonpolar environment, it was assumed that interactions were established and that the method of freeze-drying was successful. Generally the results of this work showed that the interactions between studied solutes were successfully supported. It means that hydrophobes were solubilized by native hyaluronan.

This work could be a step in the development of biocompatible and biodegradable carriers for hydrophobic drugs with targeted distribution of the active compound based on native hyaluronan. Though the fluorescence results are promising they should be supported by other technique.

5 References

1. Lapčík L., De Smedt S., Demeester J. and Chabreček P. (1998) Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chem Rev* 98: 2663–2684. doi:10.1021/cr941199z.
2. Girish K. S. and Kemparaju K. (2007) The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sci* 80: 1921–1943. doi:10.1016/j.lfs.2007.02.037.
3. Isacke C. M. and Yarwood H. (2002) The hyaluronan receptor, CD44. *The International Journal of Biochemistry* 34: 718–721, doi:10.1016/S1357-2725(01)00166-2
4. Brown T (2008) The Development of Hyaluronan as a Drug Transporter and Excipient for Chemotherapeutic Drugs. *Curr Pharm Biotechnol* 9: 421–436, doi:10.2174/138920108785161514.
5. Jin Y., Ubonvan T. and Kim D. (2010) Hyaluronic Acid in Drug Delivery Systems. *J. Pharm Invest* 40: 33–43, doi:10.4333/KPS.2010.40.S.033
6. Ossipov DA (2010) Nanostructured hyaluronic acid-based materials for active delivery to cancer. *Expert Opin Drug Delivery* 7: 681–703, doi:10.1517/17425241003730399.
7. Lu K. W., Teausch H. W. and Clements J. A. (2013) Hyaluronan with dextran added to therapeutic lung surfactants improves effectiveness in vitro and in vivo. *Exp Lung Res* 39: 191–200, doi:10.3109/01902148.2013.791893.

8. Thalberg K. and Lindman B. (1989) Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *The Journal of Physical Chemistry* 93: 1478–1483, doi:10.1021/j100341a058.
9. Scott J. E., Chen Y. and Brass A. (1992) Secondary and tertiary structures involving chondroitin and chondroitin sulphates in solution, investigated by rotary shadowing/electron microscopy and computer simulation. *Eur J. Biochem* 209: 675–680, doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb17335.x.
10. Haxaire K., Marechal Y., Milas M. and Rinaudo M. (2003) Hydration of hyaluronan polysaccharide observed by IR spectrometry. II. Definition and quantitative analysis of elementary hydration spectra and water uptake. *Biopolymers* 72: 149–161, doi:10.1002/bip.10342.
11. Maréchal Y., Milas M. and Rinaudo M. (2003) Hydration of hyaluronan polysaccharide observed by IR spectrometry. III. Structure and mechanism of hydration. *Biopolymers* 72: 162–173, doi:10.1002/bip.10343.
12. Tsinontides S. C. et al (2004) Freeze drying – principles and practice for successful scale-up to manufacturing. *Int J. Pharm* 280: 1–16, doi:10.1016/j.ijpharm.2004.04.018.
13. Ni N., Tesconi M., Tabibi S. E., Gupta S. and Yalkowsky S. H. (2001) Use of pure t-butanol as a solvent for freeze-drying: a case study. *Int J. Pharm* 226: 39–46, doi:10.1016/S0378-5173(01)00757-8.
14. Teagarden K. L., Baker D. S. and Stenevson C. L. (2002) Practical aspects of lyophilization using non-aqueous co-solvent systems. *Eur J Pharm Sci* 15: 359–402, doi:10.1016/S0928-0987(01)00221-4.
15. Vareur B. (2002) Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Wiley-VCH, Weinheim, 381 p.

This work was supported by project Nr. LO1211, Materials Research Centre at FCH BUT-Sustainability and Development (National Programme for Sustainability I, Ministry of Education, Youth and Sports).

The Self-Degradation of Hyaluronan

Jakub Mondek

Vasile Simulescu, Michal Kalina, Miloslav Pekař

*Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Physical and Applied Chemistry,
Centre for Materials Research
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic
xcmondek@fch.vutbr.cz*

1 Introduction

One of the most important polysaccharide originated in mammal body is sodium salt of hyaluronic acid (HA). Its importance strongly increased in the last two decades. A lot of studies have focused on its physical-chemical behaviour, role in tissue, cell proliferation and developed ways how to use this polysaccharide in wound healing, drug delivery system, anti-ageing application and so on.

Hyaluronan is a linear natural polysaccharide of the glycosaminoglycans family. Its chemical structure comprises disaccharide units composed of b-D-glucuronic acid and N-acetyl-b-D-glucosamine, which are alternatively linked through (1→3) and (1→4) glycosidic bonds [→4)- b-D-GlcA-(1→3)- b-D-GlcNAc-(1→]¹.

Different molar mass hyaluronan has different role in body. For example high molar mass hyaluronan organizes extracellular matrix and low molar mass hyaluronan can be found in injured tissue or in certain tumours^{2,3}. This means, that high molar mass hyaluronan in human body reflects normal tissue, but low molar mass hyaluronan reflects damaged or stressed tissue⁴.

For the above mentioned reasons many scientific groups reported studies how to influence hyaluronan molar mass or what can cause its degradation. Most of methods how to cleave hyaluronan is summarized in review from Stern et al. published in 2007⁴. For example enzymatic degradation and non-enzymatic degradation of hyaluronan, ultrasonication, temperature and other methods are described. Enzymatic degradation seems to be most suitable for preparation of hyaluronan fragments with lower molar mass. Low or high pH conditions have obvious effect on hyaluronan. Random chain scission occurs during hydrolytic degradation^{1,5,6}. As well as random chain scission occurs during hydrolytic degradation, the same mechanism was proposed for thermal degradation of hyaluronan^{7,8}. The opposite conclusion to hydrolysis and thermal degradation was made to ultrasonication. Hyaluronan degrades in a non-random way when exposed to ultrasound resulting in a bimodal molar mass distribution⁹.

There was very little information on the stability of hyaluronan molecular mass in solutions after hyaluronan powder is dissolved in water. In other words, little information on degradation of hyaluronan solutions prepared and stored in laboratory for various purposes. This is the sum of our work on this issue^{10,11,12}.

2 Experimental

The degradation of hyaluronan samples of four different molar masses was studied by SEC-MALLS technique in order to observe the changes of molar mass, polydispersity and polymer conformation in time. The SEC-MALLS equipment used in the present work was produced by Wyatt (USA; the detector part) and by Agilent (USA; the chromatography part). It included MALLS detector (Dawn Heleos II), viscometric detector (ViscoStar II) and RI detector (Optilab TrEX). The multi angle laser light scattering detector had 18 angles of detection, ranging from 10° to 160°. Astra 6 software package was used for data collection and analysis. The chromatograph contained degasser, isocratic pump, autosampler, column for size exclusion chromatography (one PL aquagel-OH MIXED-H 8 mm PL1149-6800 produced by Agilent was used), and thermostat. The mobile phase used was 0.1 M NaNO₃ aqueous solution, containing 3 mM Na₃N to prevent microorganism growing. Sodium azide is commonly used protectant of hyaluronan solutions. All SEC-MALLS measurements were performed at 25 °C.

All hyaluronic acid samples which were at disposal for this study were obtained from Contipro (Czech Republic) where were produced by fermentation (*Streptococcus equi*, subsp. *Zooepidemicus* bacterial strain). The product names and their actual weight averaged molar masses of samples with protection against microorganisms, measured in our laboratory, were as follows (product name – M_w measured in our laboratory):

- 1 MDa – 526 kDa
- 0.75 MDa – 633 kDa
- 200–300 kDa – 176 kDa
- 10–150 kDa – 17 kDa

The product names and their actual weight averaged molar masses of samples without protection against microorganisms, measured in our laboratory, were as follows (product name – M_w measured in our laboratory):

- 1750 kDa – 1161 kDa
- 300–500 kDa – 267 kDa
- 90–130 kDa – 14 kDa

The solutions of hyaluronic acid were prepared with the same solvent as the mobile phase.

3 Results and Discussion

At room temperature, we observed an exponential or perhaps hyperbolic decrease of M_w in time (Figure 1). We can see that after certain period of fast decrease of molar mass, the degradation rate at room temperature is very small.

After more than 90 days in the fridge, only a small decrease in molar mass was observed, especially for the samples with higher molar masses. The values of molar mass found after 90 days for the samples kept in the fridge were still higher than the values of molar mass found for the samples kept at room temperature. This proved that the degradation is much slower for the samples kept in the fridge than for the same samples kept at room temperature, in accord with Arrhenius law.

The conformation plots for HA 1 MDa, HA 0.75 MDa and HA 200–300 kDa samples at different periods, at room temperature and in the fridge, gave the value of a coefficient

between 0.5 and 0.7. This value indicates that the polymer shape is random coil and it was not changed during storage and degradation during the storage.

The Mark-Houwink-Sakurada plots confirmed the random coiled shape of HA 1 MDa, HA 0.75 MDa and HA 200-300 kDa samples. For these samples the coefficients found from the MHS slopes (a) showed values ranging from 0.5 to 0.8 as expected for random coiled polymers.

In the case of the shortest hyaluronan chains, sample HA 10–150 kDa, the coefficients found from the MHS plot showed different values, between 1.2 and 1.54, not changing during the storage. All the coefficients found from MHS plot for HA 10–150 kDa are higher than for the other hyaluronan samples analysed. The maximum value of this coefficient for random coiled polymer is 0.8 and the value expected for rigid rod is 1.8. MHS thus proved that the shape of HA 10–150 kDa is between random coil and rigid rod.

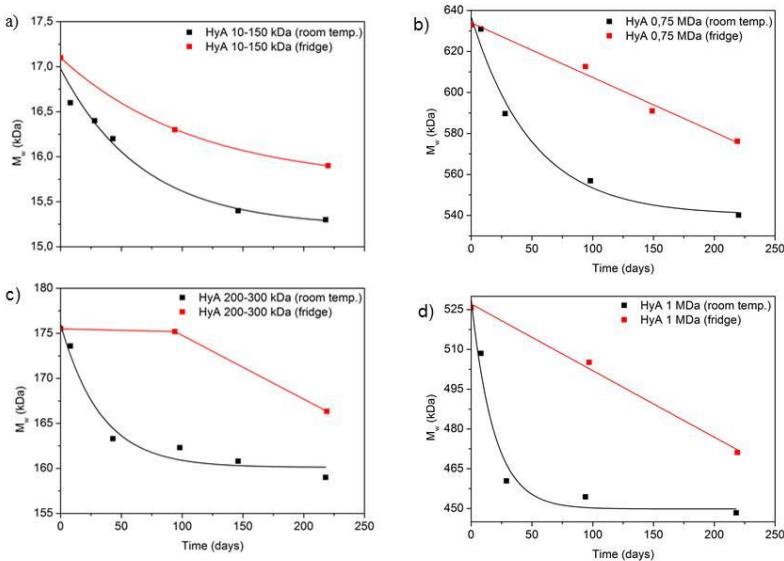


Figure 1: The degradation of HA 10-150 kDa (a), HA 0.75 MDa (b), HA 200-300 kDa (c) and HA 1 MDa (d) in time at room temperature and in the fridge with protection against microorganisms.

According to Tokita and Okamoto⁵, degradation of hyaluronan obeys first order kinetics. Dependencies of molar mass on time, determined in samples kept at room temperature, may suggest exponential decay of the first order kinetics. By plotting the data in the form of linearized first order kinetic equation,

$$\ln M_w = -kt + \ln M_{w0} \quad (1)$$

we found out that dependencies are not linear (k is the slope, t is the time, M_{w0} is the initial molar mass at zero time).

We proposed two degradation models for the rate of hyaluronan degradation. First model was based on fitting straight lines through data points shown in Figure 1. In the

case of room temperature degradation, two linear fits were applied e one for each of the two detected phases. In fact, this is a zero order kinetic model (two such models in the case of the room temperature storage) e the linear decrease of molar mass:

$$M_W = M_{W0} + k_0 t \quad (2)$$

Gives by differentiation:

$$\frac{dM_W}{dt} = k_0 \quad (3)$$

The second degradation model, applicable only for samples stored at the room temperature, was designed empirically taking into account the exponential decrease of the molar mass:

$$M_W = M_\infty + M_{diff}e^{-kt} \quad (4)$$

where the parameter M_∞ represents the theoretical asymptotic value at $t \rightarrow \infty$ ($\Rightarrow e^{-\infty} \rightarrow 0 \Rightarrow M_W \rightarrow M_\infty$) and the second parameter M_{diff} represents the difference between the initial molar mass and the asymptotic value. Fit of $M_W = f(t)$ with equation $M_W = M_\infty + M_{diff}e^{-kt}$ (4) yields the overall rate constant k . All kinetic parameters are summarized in Table 1. Equation $M_W = M_\infty + M_{diff}e^{-kt}$ (4) was also used, as the only suitable model, in the study of thermal degradation of hyaluronan⁷.

Table 1: Parameters of kinetic models, adjusted R-square values, and times of the end of the first degradation phase (t_e); samples stored at room temperature and in the refrigerator**.*

Sample name	10-150 kDa	200-300 kDa	0.75 MDa	1 MDa
k^* (h ⁻¹)	-6.2·10 ⁻⁴	-1.3·10 ⁻³	-8.3·10 ⁻⁴	-2.2·10 ⁻³
adj. R-square _{exp} *	0.97	0.96	0.96	0.95
M_{init} (kDa)	15.2	160	540	450
M_{diff} (kDa)	1.8	16	97	80
k_{01}^* (kDa h ⁻¹)	-7.6·10 ⁻⁴	-1.2·10 ⁻²	-6.8·10 ⁻²	-9.4·10 ⁻²
k_{02}^* (kDa h ⁻¹)	-2.2·10 ⁻⁴	-1.1·10 ⁻³	-1.0·10 ⁻²	-2.6·10 ⁻³
t_e (h)	1073	1022	808	706
adj. R-square ₀₁ *	0.78	0.99	0.89	1.00
adj. R-square ₀₂ *	0.80	0.98	0.78	0.94
k_0^{**} (kDa h ⁻¹)	-2.2·10 ⁻⁴	-2.9·10 ⁻³	-1.1·10 ⁻²	-1.1·10 ⁻²
adj. R-square ₀₀ **	0.85	1.00	0.98	0.99

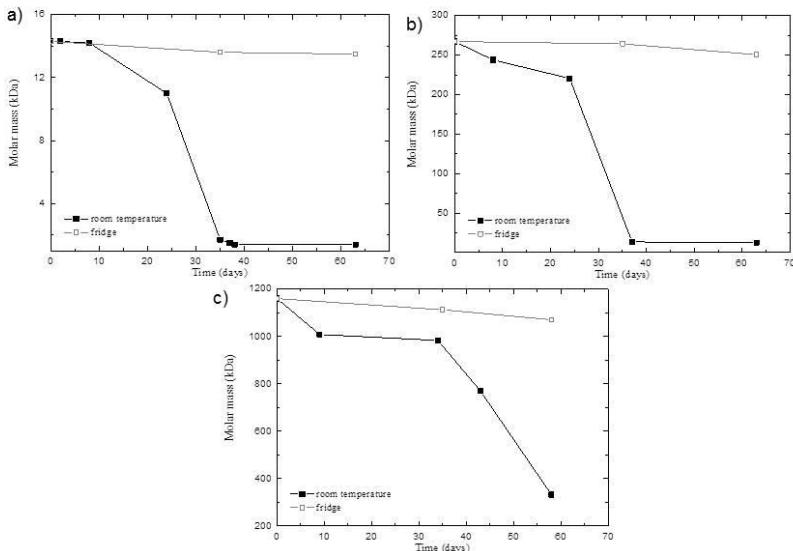


Figure 2: The degradation of HA 90-130 kDa (a), HA 300-500 kDa (b) and HA 1750 kDa in time at room temperature and in the fridge without protection against microorganisms

The degradation of hyaluronan samples in absence of sodium azide is depicted in Figure 2. The degradation of the HA 90–130 kDa sample without protection against microorganisms at room temperature showed a plateau in the first 8 days. The weight averaged molecular weight measured after 8 days was lower by only 0.1 kDa than the weight averaged molecular weight initially measured for its fresh solution. The HA 90–130 kDa sample was the most stable to degradation out of all the samples used in the present study. After 9–10 days at room temperature, the microorganisms were developed enough to degrade the polymer very rapidly, up to a weight average molecular weight of 1.7 kDa after 35 days and of 1.4 kDa after 60 days (a percentage change in weight average molecular weight – the percentage of hyaluronan degradation between initial measured weight average molecular weight and M_w measured after 60 days – of 90%).

For the HA 300–500 kDa sample we observed a faster degradation (percentage change in weight average molecular weight of 95% for HA after only 35 days). For the HA 90–130 kDa and HA 300–500 kDa samples the degradation had almost stopped after 40 days, and it showed a second plateau (Figure 2). In the case of HA 1750 kDa (Figure 2), the degradation was slower at the beginning (percentage change in weight average molecular weight of 15% after 30 days). Its degradation increased later, and it showed a percentage change in weight average molecular weight of 71% after 60 days. The second plateau for HA 1750 kDa was reached after more than 2 months of storage at room temperature.

Even without any protection against microorganisms, the hyaluronan solutions could be stored in the refrigerator for 60 days without significant weight average molecular weight change. The degradation is much slower for the samples kept in the

refrigerator than for the same samples kept at room temperature, in accordance with the Arrhenius law

From the Mark-Houwink-Sakurada plots, a randomly coiled shape was confirmed for the HA 1750kDa samples throughout the entire degradation process. Assessing the HA 300-500 kDa sample, we can observe that the random coil conformation was also proved for its fresh solution, for the solutions stored in the refrigerator and for the solution degraded at room temperature for 8 days. However, when the degradation was more rapid, after more than 8 days at room temperature, the HA 300-500 kDa was already too short to form a random coil conformation, and the MHS coefficients increased. In this case the conformation of HA 300-500 kDa was between random coil and rod. On the other hand, the conformation of the HA 90-130kDa sample was between random coil and rod from the beginning.

4 Conclusion

As expected the degradation of hyaluronic acid dissolved in water with sodium azide was slower than in the absence of sodium azide. This means that microorganisms are responsible for very fast degradation of hyaluronan at room temperature. The aqueous solutions of hyaluronic acid could be stored at room temperature for 8 days without protection against microorganisms. After this period, the microorganisms were developed enough to degrade hyaluronan very rapidly (percentage change in weight average molecular weight of 90 % for 14.3 kDa, 95 % for 267.2 kDa and 71 % for 1160.6 kDa hyaluronan after 60 days). In the refrigerator, the hyaluronan samples were very stable to degradation even up to 60 days of storage (percentage change in weight average molecular weight of just 5.6 % for 14.3 kDa, 6.2 % for 267.2 kDa and 7.7 % for 1160.6 kDa hyaluronan). The decrease in hyaluronan molar mass during storage of its solutions in water (with added antimicrobial agent) was relatively small, even after several months. The storage conditions for the solid hyaluronan used to prepare the solutions seem to outweigh the effect of molecular mass on the degradation rate. At room temperature the degradation exhibited two phases – a fast initial phase followed after 1–1.5 month by a slow phase. The data at room temperature could be satisfactorily fitted by two kinetic models – a two-part zero-order model and an exponential model. The data collected for refrigerator storage showed essentially a linear decrease in molecular mass over time and were fitted using a single zero-order model.

5 References

1. LAPČÍK, Lubomír, Lubomír LAPČÍK, Stefaan DE SMEDT, Joseph DEMEESTER a Peter CHABREČEK. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chemical Reviews*. 1998, 98(8): 2663-2684. DOI: 10.1021/cr941199z. ISSN 0009-2665.
2. QHATTAL, Hussaini Syed Sha a Xinli LIU. Characterization of CD44-Mediated Cancer Cell Uptake and Intracellular Distribution of Hyaluronan-Grafted

- Liposomes. Molecular Pharmaceutics. 2011, 8(4): 1233-1246. DOI: 10.1021/mp2000428. ISSN 1543-8384.
3. NOBLE, Paul W. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. Matrix Biology. 2002, 21(1): 25–29. DOI: 10.1016/S0945-053X(01)00184-6. ISSN 0945053x.
 4. STERN, Robert, Grigorij KOGAN, Mark J. JEDRZEJAS a Ladislav ŠOLTÉS. The many ways to cleave hyaluronan. Biotechnology Advances. 2007, 25(6): 537–557. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.07.001. ISSN 07349750.
 5. TOKITA, Y. a A. OKAMOTO. Hydrolytic degradation of hyaluronic acid. Polymer Degradation and Stability. 1995, 48(2): 269–273. DOI: 10.1016/0141-3910(95)00041-J. ISSN 01413910.
 6. REED, Christopher E. a Wayne F. REED. Light scattering power of randomly cut random coils with application to the determination of depolymerization rates. The Journal of Chemical Physics. 1989, 91(11): 7193–. DOI: 10.1063/1.457286. ISSN 00219606.
 7. BOTHNER, H., T. WAALER a O. WIK. Limiting viscosity number and weight average molecular weight of hyaluronate samples produced by heat degradation. International Journal of Biological Macromolecules. 1988, 10(5): 287–291. DOI: 10.1016/0141-8130(88)90006-2. ISSN 01418130.
 8. REHÁKOVÁ, Milena, Dušan BAKOŠ, Maroš SOLDÁN a Katarína VIZÁROVÁ. Depolymerization reactions of hyaluronic acid in solution. International Journal of Biological Macromolecules. 1994, 16(3): 121–124. DOI: 10.1016/0141-8130(94)90037-X. ISSN 01418130.
 9. VERCROYSE, K P, A R LAUWERS a J M DEMEESTER. Absolute and empirical determination of the enzymatic activity and kinetic investigation of the action of hyaluronidase on hyaluronan using viscosimetry. Biochemical Journal. 1995, 306(1): 153–160. DOI: 10.1042/bj3060153. ISSN 0264-6021.
 10. SIMULESCU, Vasile, Jakub MONDEK, Michal KALINA a Miloslav PEKAŘ. Kinetics of long-term degradation of different molar mass hyaluronan solutions studied by SEC-MALLS. Polymer Degradation and Stability. 2015, 111: 257–262. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2014.12.005. ISSN 01413910.
 11. MONDEK, Jakub, Michal KALINA, Vasile SIMULESCU a Miloslav PEKAŘ. Thermal degradation of high molar mass hyaluronan in solution and in powder; comparison with BSA. Polymer Degradation and Stability. 2015, 120: 107–113. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2015.06.012. ISSN 01413910.
 12. SIMULESCU, Vasile, Michal KALINA, Jakub MONDEK a Miloslav PEKAŘ. Long-term degradation study of hyaluronic acid in aqueous solutions without protection against microorganisms. Carbohydrate Polymers. 2015, DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.10.101. ISSN 01448617.

Acknowledgement

This work was supported by the Materials Research Centre at FCH BUT-Sustainability and Development, REG LO1211 with financial support from the National Programme for Sustainability I (Ministry of Education, Youth and Sports), and the project Excellent Teams – CZ.1.07/2.3.00/30.0005.

Differential mobility spectrometry as a tool for analysis of narcotics and explosives

*Martin Pavlačka^a, Petra Bajerová^a, Kateřina Kortánková^b, Jiří Bláha^b,
Michal Zástěra^b, Roman Mázl^b, Karel Ventura^a*

^a University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry,
Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic

^b RS DYNAMICS s.r.o., Starochodovská 1359/86, 14900 Prague 4, Czech Republic

email: st26874@student.upce.cz

1 Introduction

With the increasing worldwide terrorist attacks of explosives and dealing with drugs, detection of hidden explosives and drugs in luggage at the airports, sport stadiums, concert halls, power stations etc. becomes a challenging branch in analytical chemistry. Differential mobility spectrometry (DMS) can be used as standalone detector in many applications such as detection of explosives [1], illicit drugs [2] or warfare agents [3].

DMS is known as a powerful tool for separation and characterization of gas-phase ions. In DMS, ions are distinguished by the difference between mobilities at high and low electric field. With increasing electric field ion mobility coefficient (K) becomes to be dependent on the ratio of electric field to number of density of the gas (E/N):

$$K = K_0 \left\{ 1 + \alpha_2 \left(\frac{E}{N} \right)^2 + \alpha_4 \left(\frac{E}{N} \right)^4 + \dots \right\} = K_0 \cdot (1 + \alpha) \quad (1)$$

K_0 is ion mobility coefficient at the low field at standard pressure and temperature. α parameter describes the dependence of K on the electric field. α_2 and α_4 are specific alpha coefficients. The change in mobility of the ion at elevated E/N is described as alpha function:

$$\alpha \left(\frac{E}{N} \right) = \left\{ \alpha_2 \left(\frac{E}{N} \right)^2 + \alpha_4 \left(\frac{E}{N} \right)^4 + \dots \right\} \quad (2)$$

where α_2 and α_4 are parameters of ion behaviour in high field strength. Based on these parameters ion mobility coefficient at field strength K (E/N) can be calculated, where E is in ($V \text{ cm}^{-1}$) and N is a gas number density in (cm^{-3}). Using experimentally obtained values of compensation voltage (CV) and RF electric field, α_2 and α_4 can be calculated [4]:

$$-CV = \left(CV^3 + \frac{5}{6}CV \cdot RF^2 + \frac{1}{9}RF^3 \right) \alpha_2 + \left(CV^5 + \frac{25}{9}CV^3 \cdot RF^2 + \frac{10}{9}CV^2RF^3 + \frac{55}{72}CV \cdot RF^4 + \frac{55}{486}RF^5 \right) \alpha_4 \quad (3)$$

Eq. 3 can be represented by following equation where only two parameters α_2 and α_4 are unknown:

$$-c_1 = a_1 \cdot \alpha_2 + b_1 \cdot \alpha_4$$

$$-c_2 = a_2 \cdot \alpha_2 + b_2 \cdot \alpha_4 \quad (4)$$

...

$$-c_n = a_n \cdot \alpha_2 + b_n \cdot \alpha_4$$

where $a = \left(CV^3 + \frac{5}{6}CV \cdot RF^2 + \frac{1}{9}RF^3 \right)$, $b = \left(CV^5 + \frac{25}{9}CV^3 \cdot RF^2 + \frac{10}{9}CV^2RF^3 + \frac{55}{72}CV \cdot RF^4 + \frac{55}{486}RF^5 \right)$, $c = CV$.

Alpha is not a number like ion mobility but a function. That is why alpha should be regarded over a wide range of electric field [5]. Under the same experimental conditions the same alpha function could be obtained by any DMS instrument. The alpha function is a characteristic ion property similar to m/z in mass spectrometry.

2 Experimental section

2.1 Chemicals

The following explosives were tested as 1000 ng μL^{-1} solutions in acetone. 2,4,6-trinitrotoluene (TNT), pentaerythritol tetranitrate (PETN), 2,4,6-trinitrophenol (picric acid), 2,4-dinitrotoluene (DNT), erythritol tetranitrate (ETN), 2,4,6-trinitrophenylmethylnitramine (tetryl), 1,3,5-trinitro-perhydro-1,3,5-triazine (RDX) were purchased from Explosia a.s. Pardubice (Pardubice, Czech Republic). Dried air was used as a carrier gas. Samples of cocaine and methamphetamine were diluted in acetone. 3 μL of each explosive and narcotic were applied to DMS.

2.2 Instrumentation

Experiments were measured using a prototype of DMS analyzer with ^{63}Ni as an ionization source. DMS analyzer is not fully stand-alone device, it downloads basic parameters and configuration from PC, while runtime behavior is controlled by embedded single chip microprocessor. It is responsible for proper timing of critical processes during measurement scans, like RF voltage control, compensation voltage control, synchronous A/D conversion, and data averaging followed by sending it to the PC.

DMS conditions for measurements: RF was applied from 500 to 1500 V, scanning range of CV was from 15 V to -40 V, flow rate of the carrier gas was 50 mL min⁻¹ and temperature was controlled from 80 °C to 100 °C and 65 °C for narcotics.

2.3 Software

Presented results of measurements have been evaluated by use of special software tool developed for visualization, comparison and identification of measured data. This tool directly communicates with DMS in real time. The crucial part of the visualization software are two 2D dispersion plots where vertical axis stand for RF voltage and horizontal axis stand for compensation voltage of the DMS. Each pixel in the dispersion plot maps ion intensity value for given combination of RF voltage and compensation voltage to a specific color according to user configurable color palette. The color slope gradient of the palette can be refined in five intervals in order to achieve the best contrast picture as possible. It is supported also by autoscale features with sophisticated options how to fix (or cut & paste) some visualization parameters for best recognition and classification of measured data by the user and data comparisons. The specialized software tool allows also basic mathematical manipulation across data sets e.g., data averaging, image sharpening, background subtraction, etc. Whereas the main 2D dispersion plot can visualize only one measurement in given time and provide good user experience for data overview, the synchronized perpendicular marginal 1D spectra belonging to selected cross section within dispersion plot can display also cumulated and combined data sets and allow precise reading of position and amplitude of peaks for further computations.

3 Results and discussions

Reactant ion peak (RIP) is formed by interaction of carrier gas (dried air) with high energy electrons from ⁶³Ni. This process is simultaneous in positive and negative mode at the same time. H⁺(H₂O)_n and O₂⁻(H₂O)_n are reactant ions in positive and negative polarity with dried air as a carrier gas. Considering proton/electron affinities of analyte (M), the RIP ions transfer their charge to M by collisions. M replaces water molecule(s) to form monomer or dimer ions, respectively [6]. Explosives were measured in negative channel due to their high electron affinities instead of narcotics, with high proton affinities, were measures in positive mode.

DMS analysis of RDX, TNT, 2,4-DNT, PETN, picric acid, ETN, and tetryl were performed. Typical dispersion plot and compensation voltage scan at fixed separation voltage of explosive (RDX) measured in negative channel is shown in Fig. 1. Dispersion plot shows ion intensity and compensation voltage at each separation field. Below the dispersion plot is differential mobility spectrum showing ion current as a function of CV for RIP and for product ion peak (PIP). The signal intensity at specific RF depends on the concentration of ion in the sample. Compensation voltage of PIP at 1060 RF voltage at 100 °C in negative channel is 1.34 V for RDX (Fig 1 b). Compensation voltage of RIP for RDX is -25.23 V which agree with dispersion plot of blank shown in Fig. 1a. Peak at CV = -22.65 V corresponds to moisture.

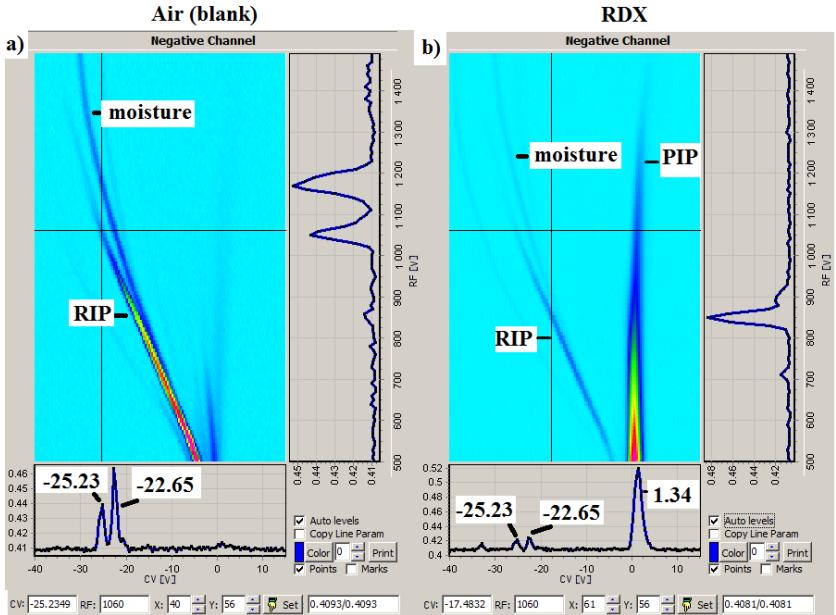


Fig. 1: DMS fingerprint spectrum (dispersion plot) of air (blank) (a) and RDX (b) in negative mode at 100 °C. Spectra shown below dispersion plots were isolated at separation voltage of RF = 1060 V

According to DMS analysis (characteristic CV at fixed RF for each explosive) specific coefficients α_2 and α_4 (using Eq. 3) were calculated. Nonlinear α functions of explosives are summarized in Table 1. The units of α_2 and α_4 are 10^{-6} Td^2 and 10^{-10} Td^4 , respectively.

Table 1: The nonlinear α functions of explosives

DNT	$\alpha = 3.2138 \cdot 10^{-6} (\text{E/N})^2 - 1.7620 \cdot 10^{-10} (\text{E/N})^4$
TNT	$\alpha = 2.6164 \cdot 10^{-6} (\text{E/N})^2 - 2.8450 \cdot 10^{-10} (\text{E/N})^4$
Picric acid	$\alpha = 0.8267 \cdot 10^{-6} (\text{E/N})^2 - 1.4897 \cdot 10^{-10} (\text{E/N})^4$
Tetryl	$\alpha = -1.6122 \cdot 10^{-6} (\text{E/N})^2 + 0.5013 \cdot 10^{-10} (\text{E/N})^4$
PETN	$\alpha = -1.8191 \cdot 10^{-6} (\text{E/N})^2 + 0.1220 \cdot 10^{-10} (\text{E/N})^4$
RDX	$\alpha = -1.4322 \cdot 10^{-6} (\text{E/N})^2 - 0.4305 \cdot 10^{-10} (\text{E/N})^4$
ETN	$\alpha = -2.6487 \cdot 10^{-6} (\text{E/N})^2 + 0.6459 \cdot 10^{-10} (\text{E/N})^4$
HMTD	$\alpha = 1.0525 \cdot 10^{-6} (\text{E/N})^2 - 2.1533 \cdot 10^{-10} (\text{E/N})^4$

Fig. 2 shows curves of α versus E/N for explosives in negative channel built up using Eq. 2. The alpha function of explosives were drawn for E/N up to 120 Td.

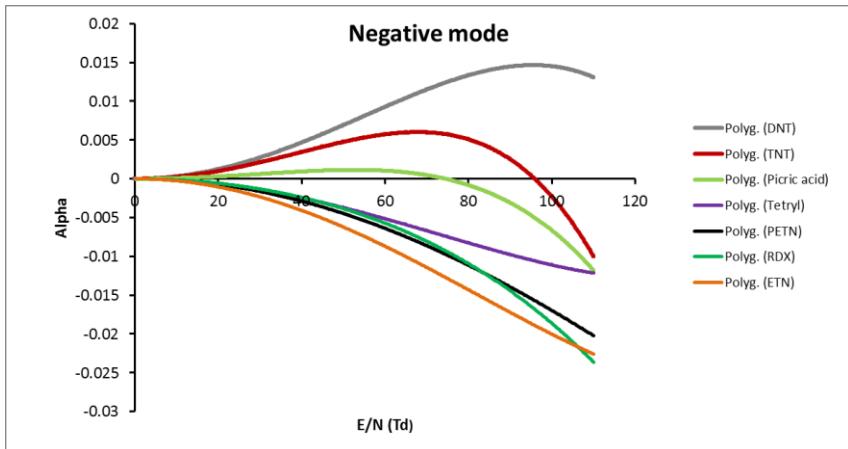


Fig. 2: Nonlinear function curve of explosives ions in negative channel

DMS analysis of narcotics is shown in Fig. 3. RIP of blank at RF = 1060 V appears at CV = -23.02 V (Fig. 3a) which corresponds to RIP of narcotics sample (Fig. 3b). Measured sample contained mixture of methamphetamine and cocaine. PIP of methamphetamine at RF = 1060 V appears at CV = -4.93 V, PIP of cocaine at RF = 1060 V appears at CV = 1.34 V.

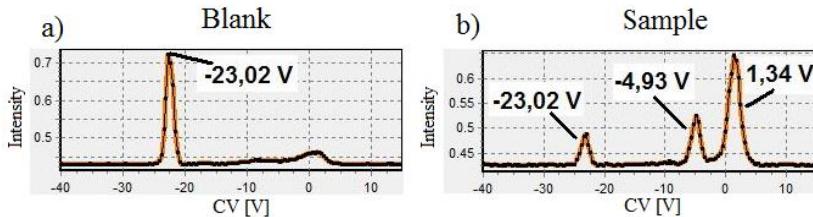


Fig. 3 Differential mobility spectrum of blank (Fig. 3a) and sample of narcotics (Fig. 3b) at RF = 1060 V

4 Conclusion

This study deals with analysis of explosives and narcotics using DMS. For each target compound, characteristic compensation voltage was determined. Compensation voltage was assessed as compound specific parameter in DMS analysis which enables characterization of measured compounds. DMS proved to be an important analytical

technique with outstanding sensitivity and selectivity in analysis of explosives and narcotics.

5 Acknowledgment

This study was financially supported by the Research plan No. VG20132015107 "DRAGON - The Hand-held Narcotic Compounds Sniffer & Analyzer (2013-2015, MV0/VG)", which is financed by the Ministry of the Interior of the Czech Republic. (Security Research for the Needs of the State 2010-2015).

6 References

1. Eiceman, G.A., et al., *Separation of Ions from Explosives in Differential Mobility Spectrometry by Vapor-Modified Drift Gas*. Analytical Chemistry, 2004. 76(17): p. 4937–4944.
2. Mohsen, Y., et al., *Detection of Δ9-Tetrahydrocannabinol, Methamphetamine and Amphetamine in air at low ppb level using a Field Asymmetric Ion Mobility Spectrometry microchip sensor*. Procedia Engineering, 2014. 87(0): p. 536–539.
3. Maziejuk, M., et al., *Fragmentation of molecular ions in differential mobility spectrometry as a method for identification of chemical warfare agents*. Talanta, 2015. 144: p. 1201–1206.
4. Shvartsburg, A.A., *Differential ion mobility spectrometry: nonlinear ion transport and fundamentals of FAIMS*. 2008.
5. Krylov, E.V. and E.G. Nazarov, *Electric field dependence of the ion mobility*. International Journal of Mass Spectrometry, 2009. 285(3): p. 149–156.
6. Shvartsburg, A.A., et al., *Ultrafast Differential Ion Mobility Spectrometry at Extreme Electric Fields in Multichannel Microchips*. Analytical Chemistry, 2009. 81(15): p. 6489–6495.

Characterization of the Colloidal Properties of a Microbubble Contrast Agent

Tereza Pilgrová

Klára Říkovská, Miloslav Pekař

*Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Physical and Applied Chemistry
Purkyňova 464/118, 61200 Brno, Czech Republic
xckrutisova@fch.vutbr.cz*

1 Introduction

Microbubbles are used as contrast agents in combination with ultrasound mostly for cardiovascular imaging and the assessment of perfusion of various organs and tumors¹. These particles of the size range 0.5–10 µm are usually stabilized by a thin shell composed of phospholipids, lipids, polymers or a combination of these materials². The core of microbubbles is typically filled with an inert and high molecular weight gases (such as perfluorocarbon or sulphur hexafluoride). These gases prolong the circulation time of contrast agent³. The gas core comprises most of the particle volume and provides the mechanism for ultrasound backscatter and drug delivery. Microbubbles have a one specific advantage compared to other drug carriers like liposome or nanoparticles. They can be visualized through diagnostic ultrasound and destroyed precisely on the target site, thus releasing their therapeutic load. Furthermore, microbubbles in combination with ultrasound can transiently enhanced permeability of several biological barriers^{4,5}. Oscillation behavior and fragmentation of microbubble in ultrasound field depend on the physico-chemical properties of the microbubble shell, microbubble diameter, drug loading, etc. For development of new contrast agents or drug delivery systems is necessary to know and adjust functional and structural properties of microbubble components and identify process of microbubble formation. Functional properties include injectability, ultrasound scattering efficiency, rheology and biocompatibility of microbubbles. Structural properties refer to the structure or physical properties of the microbubble⁶.

SonoVue® (Bracco Imaging SpA, Milan, Italy) is a stabilized microbubble preparation containing sulphur hexafluoride, an echogenic, poorly soluble gas. The microbubbles of gas are stabilized in aqueous dispersion by a monolayer of phospholipids. After reconstitution of the lyophilisate with sodium chloride solution for injection, these gas-containing phospholipids are in dispersion in the aqueous vehicle. As with other dispersed systems used as ultrasound contrast media, the active part of the product (the echogenic system) is the interface between the gas and the liquid phase in the microbubble dispersion.

In this work, we focused on study of formation process of microbubble and evaluation of size distribution of microbubble SonoVue® and phospholipid liposomes in order to getting round difficult preparation of SonoVue® agent through lyophilisation process. These pilot measurements should be used as basis for development of new contrast agent for drug delivery applications.

2 Experimental

SonoVue® (Bracco Imaging S.p.A, Italy) is an ultrasound contrast agent that contains the active substance sulphur hexafluoride (a gas). It is available as a kit including one vial of gas and powder and one pre-filled syringe containing 5 ml of solvent. When made up into a solution, SonoVue® contains gas as microbubbles in suspension in a liquid. The shell of SonoVue® microbubbles consists of a thin and flexible membrane of amphiphilic phospholipids (distearoylphosphatidylcholine – DSPC, dipalmitoylphosphatidylglycerol sodium – DPPG.Na and palmitic acid) and polyethyleneglycol (PEG 4000) as a monolayer with the hydrophilic surface on the outside and the hydrophobic surface on the inside (towards the SF6 gas). The product was reconstituted before use according to manufacturer's instructions. Aqueous phase (5 ml of 0.9% sodium chloride solution) was injected through the septum vial to the SonoVue® lyophilisate followed by hand agitation.

Analogous system to SonoVue® agent was prepared by mixing of phospholipids DSPC and DPPG.Na, palmitic acid and polyethyleneglycol. Concentration of each phospholipid in the sample was 0.38 mg/10 ml, concentration of palmitic acid was 0.08 mg/10 ml and concentration of polyethyleneglycol was 50 mg/10 ml. All of the substances were purchased from Cayman Chemical Company (MI, USA). Phospholipids DSPC and DPPG.Na were dissolved in chloroform-methanol mixture (5:1). After evaporation of volatile solvent, samples were dissolved in 10 ml of 0.9% sodium chloride solution containing palmitic acid and polyethyleneglycol. Finally, the sample was sonicated for 30 minutes at temperature 45 °C.

SonoVue® agent and analogous phospholipid preparation were characterized using dynamic light scattering method and carried out by Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Systems were evaluated from point of view particles size distribution and uniformity level of the system.

SonoVue® agent was studied using UV-VIS spectroscopy because of characterization of buoyancy process of microbubbles. Turbidity measurements, reported as absorbance A, were performed at 500 nm using UV-VIS spectrophotometer Hitachi U-3900H.

Maximum bubble pressure method (BPA-800P tensiometer) was chosen because of the process of microbubble formation during the measurement can be compared to gentler variation of bubble formation during agitation procedure when SonoVue® microbubbles are prepared. Bubble pressure tensiometer produces gas bubbles (air) at constant rate and blows them through a capillary which is submerged in the sample liquid and its radius is already known. The pressure inside of the gas bubble continues to increase and the maximum value is obtained when the bubble has the completely hemispherical shape whose radius is exactly corresponding to the radius of the capillary. Surface active substances in solution can adsorb on the bubble surface during the lifetime of bubble and affect surface tension.

Experiment with a constant lifetime was used for evaluation of surface activity (surface tension) of microbubble component. It measures the dynamic surface tension at a fixed lifetime set by the user. In this case the pneumatic system of the device holds the air flow rate constant during the whole experimental run. Bubble lifetime was set on 0.125 s and 4 s.

3 Results and discussion

Dynamic light scattering method was used for size characterization of SonoVue® agent and analogous phospholipid preparation.

In Figure 1 is shown size distribution of commercial agent SonoVue® for three times of measurement. Size distributions are different depending on measurement time. First measurement performed 3 minutes after reconstitution of SonoVue® agent shows bimodal distribution with the most of aggregates in the range of 400–650 nm and a small distribution about 100 nm. The second distribution in the time 6 minutes after preparation appears monomodal. The most of aggregates in the system have sizes in the range of 300–700 nm. The last one measurement, performed 12 minutes after preparation, is bimodal again and microbubble aggregates have either about 200 nm or are in the range of 500–1000 nm. These differences among the size distributions indicate that SonoVue® agent is not stable in time. In the system comes about some aggregation or rearrangement of microbubbles.

When we observed the microbubble solution in a cuvette, we could see a phase separation and creation of foam at the surface of solution. It was found that SonoVue® microbubbles are buoyant and have a tendency to rise quickly to the surface of the sample in the cuvette during the measurement. It is one of reasons why size distributions are different.

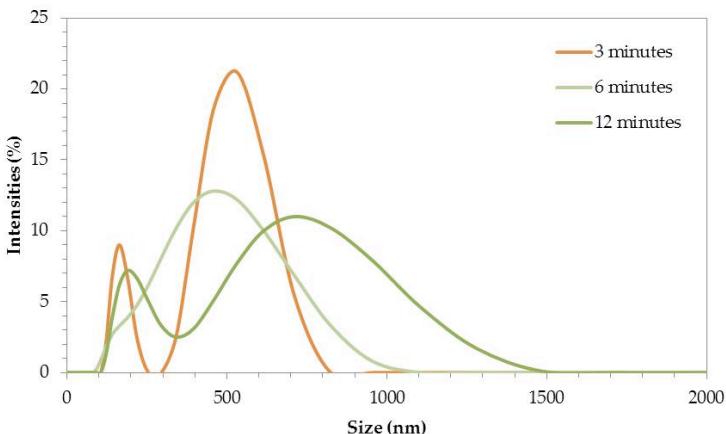


Figure 1: Size distribution of SonoVue® agent depending on time

As a follow-up to these results we studied a rate of microbubbles rise using UV-VIS spectroscopy, specifically turbidimetry measurement. Figure 2 represent a change of absorbance at 500 nm depending on measurement time. Data shows that absorbance decreases linearly and more sharply until 40 minutes after reconstitution of SonoVue® agent and then decreases more gradual until almost 7 hours after start of measurement.

In the beginning, immediately after reconstitution, SonoVue® microbubble suspension is turbid and gradually becomes clear. This corresponds with manufacturer's instructions because they report that product is chemical and physical stable until 6 hours after reconstitution.

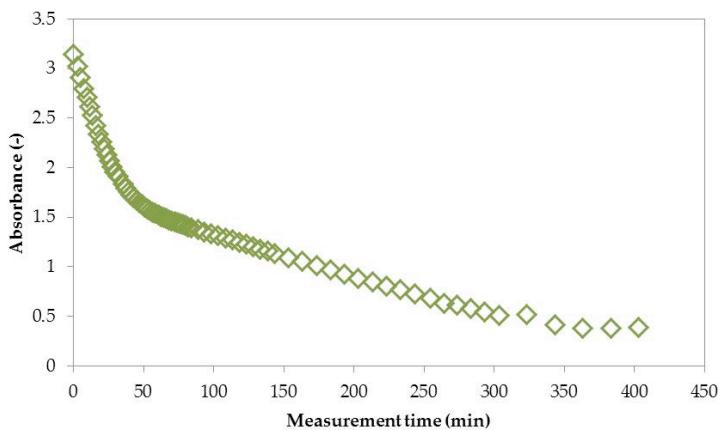


Figure 2: Dependency of absorbance on the measurement time

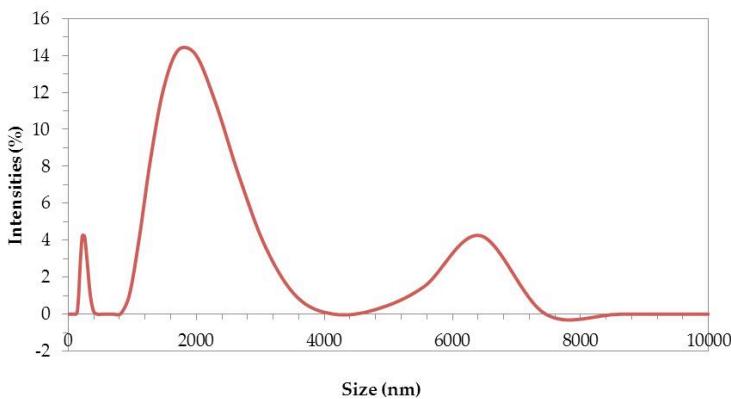


Figure 3: Size distribution of SonoVue preparation

Size distribution of phospholipids preparation was measured for comparison with SonoVue® agent and for evaluation of success rate of microbubble preparation in our laboratory. It was found that phospholipid preparation was more polydisperse than SonoVue® agent and that in this system the most of aggregates have sizes in the range of 1300–2300 nm. Some particles of sizes in the range of 5500–6400 nm were present in the system too but their distribution was minor in comparison to the main distribution about 1700 nm.

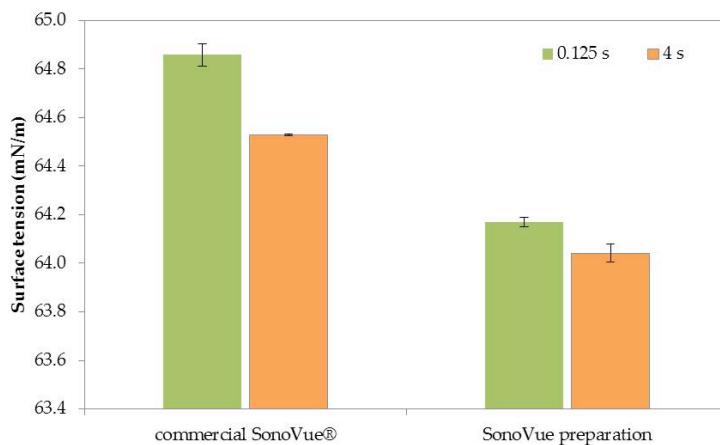


Figure 4: Surface tension of SonoVue® agent and analogous phospholipid system (green column – bubble lifetime = 0.125 s, orange column – bubble lifetime = 4 s)

Further experiments focus on microbubble formation process and surface activity of phospholipids of microbubbles. For these experiments was used maximum bubble pressure tensiometer because of its principle of the bubble formation at the tip of capillary.

In Figure 4 are shown surface tension of SonoVue® agent and analogous phospholipid system for two bubble lifetime. Surface tensions are slightly bigger in short bubble lifetime than for long time. It is caused by the diffusion rate and adsorption of surface active component on the air bubble surface. In the case of bubble lifetime 0.125 s, surface active particles have a short time to adsorption on surface of a bubble formed at the tip of capillary whereas in the case of 4 s have more time to adsorption and decreasing of surface tension. General, there are no significant differences between these measured systems. Both of them are similarly surface active.

4 Conclusion

In this work, surface activity and size distribution of contrast agent SonoVue® and analogous phospholipid systems are examined. It was found that phospholipid system prepared in our laboratory evinces a similar surface activity as commercial SonoVue®

agent that formation process is similar to each other. Size distribution of aggregates in these systems was investigated, too. It was found that a preparation method influenced the size distribution of the system unlike surface tension of the system. Our systems are more polydisperse in comparison with commercial SonoVue® agent with largely monomodal size distribution.

5 References

1. DIJKMANS, P, L JUFFERMANS, R MUSTERS, A VANWAMEL, F TENCATE, W VANGILST, C VISSER, N DEJONG a O KAMP. Microbubbles and ultrasound: from diagnosis to therapy. *European Journal of Echocardiography*. 2004, **5**(4): 245–256. DOI: 10.1016/j.euje.2004.02.001. ISSN 15252167.
2. SIRSI, S. R. a M. A. BORDEN. Microbubble compositions, properties and biomedical applications. *Bubble Science, Engineering*. 2009, **1**(1-2): 3-17. DOI: 10.1179/175889709X446507. ISSN 1758-8960.
3. LIU, Yiyao, Hirokazu MIYOSHI a Michihiro NAKAMURA. Encapsulated ultrasound microbubbles: Therapeutic application in drug/gene delivery. *Journal of Controlled Release*. 2006, **114**(1): 89-99. DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.05.018. ISSN 01683659.
4. SHEIKOV, Nickolai, Nathan MCDANNOLD, Natalia VYKHODTSEVA, Ferenc JOLESZ a Kullervo HYNYNEN. Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles. *Ultrasound in Medicine*. 2004, **30**(7): 979–989. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2004.04.010.
5. LI, Peng, Lu-qin CAO, Chun-Yan DOU, William F ARMSTRONG a Douglas MILLER. Impact of myocardial contrast echocardiography on vascular permeability: an in vivo dose response study of delivery mode, pressure amplitude and contrast dose. *Ultrasound in Medicine*. 2003, **29**(9): 1341–1349. DOI: 10.1016/S0301-5629(03)00988-8. ISSN 03015629.
6. KAUFMANN, Beat A., Kevin WEI a Jonathan R. LINDNER. Contrast Echocardiography. *Current Problems in Cardiology*. 2007, **32**(2): 51–96. DOI: 10.1016/j.cpcardiol.2006.10.004. ISSN 01462806.

This work is supported by project Materials Research Centre at FCH BUT-Sustainability and Development, REG LO1211, with financial support from National Programme for Sustainability I (Ministry of Education, Youth and Sports).

Application of Chemometrics Methods and Electronic Nose as a Simple and Fast Tool for the Classification of Different Types of Alcoholic Beverages

Silvie Surmová^a

Paulina Wiśniewska^b, Magdalena Śliwińska^b, Tomasz Dymerski^b, Waldemar Wardencki^b, Jacek Namieśnik^b, Karel Ventura^a and Aleš Eisner^a

^aUniversity of Pardubice, Faculty of Chemical Technology,

Department of Analytical Chemistry,

Studentska 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic

^bGdansk University of Technology, The Chemical Faculty, Department of Analytical Chemistry,

11/12 Narutowicza St., 80-233 Gdańsk, Poland

surmova.silvie@gmail.com

An Electronic nose (E-nose) is an analytical instrumental method which allows analysis of aroma of samples. This work uses E-nose to determine the characteristic aromas of seven different types of alcoholic beverages (bourbon, cognac, vodka etc.). Three chemometrics methods such as principal component analysis (PCA), discriminant factorial analysis (DFA) and soft independent modeling of class analogies (SIMCA) were used and compared. The results show that chemometrics methods PCA and DFA allow determination of individual alcoholic groups of fruit spirits, bourbon, cognac and brandy but they face difficulty with separation of liqueur, gin and vodka points from one group. Only the SIMCA method allowed distinguishing the point belonging to all groups without any approximation of graph fragments.

Keywords: Electronic nose, chemometrics methods, alcoholic beverages.

The author didn't submit the contribution before the proceedings deadline.

Use of passive sampler POCIS for determination of pharmaceuticals in aquatic environment

Richard Sykora^{1,2}

Milada Vavrova¹

¹Fakulta chemická, VUT v Brně

Purkyňova 464/118 Brno

²SWC InTech s.r.o.

Milady Horákové 323/12 Brno

xcsykorar@fch.vutbr.cz

1 Introduction

Worldwide production and consumption of drugs characterized by different structure increases every year. Due to the fact that these substances are not always completely eliminated in the human or animal body, subsequently get into the environment [1], which has negative effect of certain constituents of natural ecosystems [2]. Their biggest representation is in the waste water. However, it was shown that most of them are in the process of cleaning very difficult decomposable (generally in WWTP are drugs removed from 60–90%) [2, 3, 4]. From WWTP then these substances enter surface waters, where it can lead to intoxication of aquatic organisms [3, 5].

Due to the fact that concentration of pharmaceuticals in water could be time-varying, using of conventional spot sampling may not detect contamination. To obtain complex information about long-term environmental impact is therefore preferable to use the integrative passive sampling. Passive sampling also helps to simplify analytical procedure, because during sampling is made preconcentration in sampling medium [6, 7, 9]. Drugs are usually found in surface waters at trace levels that do not cause acute risks, but can become dangerous in the long-term exposure [8]. These low concentrations may not be detected when the spot sampling is used, but if passive sampling is used, when the samplers are deployed in water for even several weeks, leads to the accumulation of compounds in the sorbent, and thus can be easily analyzed [7, 9].

This study is aimed to optimize using of passive samplers POCIS (Polar Organic Compound Integrative Sampler) for the analysis of four pharmaceuticals from group of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), three from group of macrolide antibiotics and for caffeine. To calculate Time-Weighted-Average concentrations (TWA), how is called the calculated concentration of pollutants in the river when the passive sampling is used, is necessary to know the sampling rates for each compound [7]. The sampling rate for all drugs were determined experimentally using aquarium with water spiked by target

pharmaceuticals. Daily were collected samples of water and analyzed. So the real concentrations of drugs in aquarium were found. Subsequently samplers were analyzed and from results were calculated sampling rates for each pharmaceutical. Extractions of water were performed by SPE (Solid Phase Extraction) and final analysis were performed by HPLC/HRMS. POCIS samplers were subsequently used in real environment for determination of target pharmaceuticals in river Queich, Germany.

2. Results and conclusion

Table 1: Calculated sampling rates

Pharmaceutical	R _s
ketoprofen	0,4430
naproxen	0,2997
ibuprofen	0,3460
diclofenac	0,3181
caffeine	0,1242
erythromycin	0,0922
clarithromycin	0,0705
roxithromycin	0,0626



Figure 1: Map of sampling sites

Table 2: TWA concentrations

Pharmaceutical	TWA _{Sampling site A (ng/L)}	TWA _{Sampling site B (ng/L)}
ketoprofen	<LOQ - 2,70	<LOQ
naproxen	2,83	3,45
ibuprofen	3,05	2,64
diclofenac	13,61	17,72
caffeine	21,58	18,49
erythromycin	<LOQ	2,55
clarithromycin	1,31	4,59
roxithromycin	<LOQ - 0,11	<LOQ

Experimentally were found Rs for all target pharmaceuticals they are shown in *Table 1*. Passive samplers were deployed into river Queich close to town Landau. Sampling sites are displayed in *Figure 1*. TWA concentrations of each target pharmaceutical were calculated they are listed in *Table 2*. The highest concentration was detected in the case of caffeine in both sampling sites. The highest increase of concentration behind confluence of river and stream from WWTP was in case of diclofenac. In case of ketoprofen, ibuprofen, caffeine and roxithromycin were concentrations from sampling site B lower. It means that WWTP has good removing efficiency in case of these pharmaceuticals. In case of diclofenac the removing efficiency is not sufficient.

3. References

1. Cooper, E. R., Siewicki, T. C., Phillips, K. (2008) Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment. *Science of total environment*, 398 (1–3), 26–33.
2. Kotyza, J., Soudek, P., Kafka, Z., Vaněk, T. (2009) Léčiva – „nový“ environmentální polutant. *Chemické listy*, 103, 540–547.
3. Lacina, P., Ženatová, P., Vávrová, M. (2012) The assesment of contamination of selected river streams in the Czech republic by human and veterinary drug residues with liquid and gas chromatography. *Fresenius Environmental Bulletin*. Volume 21, 11a, 3318–3324.
4. Cunningham, V. L., Binks, S. P., Olson, M. J. (2009) Human health risk assessment from the presence of human pharmaceuticals in the aquatic environment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 53 (1), 39–45.
5. Hernando, M. D., Mezcuia, M., Fernández-Alba, A. R., Barceló, D. (2006) Environmental risk assesment of pharmaceutical residuem in wastewater effluents, surfaře waters and sediments. *Talanta*, 69, 334–342.
6. Pulkarbová, J., Suchanová, M., Hajšlová, J., Kocourek, V., Tomaniová, M. (2009) Využití pasivního vzorkování vod a porézních médií při sledování organických polutantů. *Chemické listy*, 103, 159–165.
7. Lobpreis, T., Vrana, B., Dercová, K. (2009) Inovatívne prístupy k monitorovaniu organických kontaminantov vo vodnom prostredí použitím pasívneho vzorkovania. *Chemické listy*, 103, 548–558.
8. Gómez, M. J., Petrović, M., Fernández-Alba, A. R., Barceló, D. (2006) Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1114 (2), 224–233.
9. Vrana, B., Mills, G. A., Allan, I. J., Dominiak, E., Svensson, K., Knutsson, J., Morrison, G., Greenwood, R. (2005) Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *Trends in Analytical Chemistry*, 24 (10), 845–868.

Study of catechin degradation in green tea by HPLC/MS

Petra Šilarová

Daniela Havlová

Lenka Česlová

*University of Pardubice Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry
Studentská 95, 532 10 Pardubice 2, Czech Republic
petra.silarova@student.upce.cz*

1 Introduction

Tea is consumed throughout the world and is the most popular beverage after water. It has been shown that fresh tea leaf is unusually rich in the flavanol group of polyphenols known as catechins. The main catechins in green tea are epigallocatechin gallate (EGCG), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG) and epicatechin (EC). Tea catechins undergo many chemical changes during the course of the manufacturing and brewing processes¹. All steps are designed to achieve optimal oxidation of tea catechins and produce tea products with good flavor and color².

The composition of tea also differs with variety, season, age of leaves, climate and horticultural practices. Nevertheless, not only phenolic compounds are responsible for total antioxidant capacity of tea infusions but also some trace elements³.

It is well known that green tea has extensive health benefits for humans. EGCG contributes to the beneficial therapeutic effects of green tea and functions as a powerful antioxidant, anti-angiogenic, anti-inflammatory and anti-tumor agent. EGCG is found to be the most potent substance against bacteria, viruses, fungi and may be a potential agent for prophylaxis of mastitis⁴. Green tea catechins are potent inhibitors of enzymes for carbohydrate digestion and influence the digestibility of starch. The fortification of green tea catechins into bread products has a significant impact on reducing the glycaemic response⁵.

Individual catechins undergo epimerisation at high temperatures. This epimerisation takes place more easily in tap water than in purified water. The complexity of the ions in tap water and the different pH between tap and purified water are thought to be the main reasons for the different conversion rates for individual catechins. Stability studies of catechins in green tea strong infusion have shown that epimerisation can be observed during prolonged storage. Therefore, it is thought that, not only temperature, but also heating time influences the epimerisation of catechins in green tea infusions¹.

This work is focused on study of catechin degradation using fast gradient HPLC/MS analysis and spectrophotometric techniques.

2 Experimental

2.1. Materials and methods

2.1.1. Materials

Green tea samples were purchased from local supermarkets or drugstores in Pardubice (Czech Republic). The standards (catechin, epicatechin, epicatechin-3-gallate, epigallocatechin, epigallocatechin-3-gallate, gallocatechin, gallokatechin-3-gallate, catechin-3-gallate, gallic acid, chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, rutin, isoquercitrin, kaempferol-3-O-glucoside, kaempferol-3-O-rutinoside, hyperoside, caffeic acid, *p*-coumaroylquinic acid) were purchased from Sigma Aldrich, USA. Deionized water was prepared by purification Milli-Q system (Merck Millipore, Germany), methanol and formic acid were purchased from Sigma Aldrich, USA.

For antioxidant capacities ABTS radical cation (Sigma Aldrich, USA), 2M Folin-Ciocalteu solvent (Sigma Aldrich, USA), K₂S₂O₈ (Laborchemie Apolda, Germany) and Na₂CO₃ (Lach-ner, Neratovice) were used.

2.1.2. Instruments and conditions

HPLC system equipped a binary gradient pump LC-20AD, autosampler SIL-20A, with a degassing unit DGU-20A (all Shimadzu, Kyoto, Japan), thermostat column LCO 102 Single (Ecom, Prague) coupled with mass spectrometry detector QTRAP 4500 (AB SCIEX, USA) were used. The reversed-phase separation of phenolic compounds was performed on Ascentis Express C18 (50 mm x 2.1 mm i.d. and 2 µm particle size) at 30 °C. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in methanol (B) using a gradient program from 20 % to 70 % B in 2.5 min. The flow rate was 0.5 mL/min. The conditions of MS analysis in negative ion-mode were as follows: Curtain gas: 20 psi, teplota: 500 °C, IonSource gas1: 50 psi, IonSource gas 2: 50 psi.

2.1.3. Samples preparing of green tea

All samples were prepared at temperatures 70, 80, 90 °C for 4 minutes (table 1). Subsequently, the infusion was cooled, filtered and after dilution analyzed by spectrophotometric techniques and HPLC/MS.

Table 1: Marks of samples

Mark	Sample	Mark	Sample
S 1	Apotheke Bio	S 6	Dukat
S 2	Jemča	S 7	Tesco
S 3	Saga	S 8	Ahmed
S 4	Pickwick	S 9	Teekanné
S 5	Dukat	S 10	Loyd

2.1.4. Spectrophotometric methods

Antioxidant capacity was measured by UV/VIS spectrometr Helios Epsilon (Thermo Scientific, Denmark). The total phenolic content of the tea extracts were measured using a 2M Folin-Ciocalteu reagent in ratio 1:9 with water. One milliliter of Folin-Ciocalteau solvent was added to one milliliter of deionized water and 30 µL of five times diluted green tea. After 5 min, 1 mL of a 7.5 % (w/v) aqueous solution of sodium carbonate (Na_2CO_3) were added and mixed well. The absorbance at 750 nm was measured against water blank after 30 min in the dark at room temperature. Total antioxidant capacity was determined using ABTS radical cation. ABTS tablet was mixed with 5 mL water and 100 µL of $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ($c = 0,064 \text{ mol/L}$). The resulting solution was left in the dark and after 12-16 hours was diluted. For experiment was used 3 mL of this solution with 30 µL five times diluted of green tea. After 10 min was measured absorbance at 734 nm. The change of absorbance was recalculated on corresponding amount of standards Trolox (ABTS method) or gallic acid (total phenolic content).

2.1.5. Statistical analysis

The experiments determining antioxidant capacity carried out in this work were repeated five times for each sample ($n = 5$). The calibration data for the ABTS and TPC methods were measured at eight Trolox or gallic acid concentration levels, respectively. Each level was measured five times ($n = 5$). The calibration data for the HPLC/UV determination of the antioxidants were measured at eight concentration levels, each level was measured four times ($n = 4$). The calibration data were fitted using a least square linear regression method in statistic program QC Expert (2.9, TriloByte). Jackknife residues and Pregibon, Wiliams and L-R graph was used for identification of influential points. The linearity of calibration curves was checked by inspecting plots of residuals. The significance of intercept of regression lines was tested using Student's t-test. Hierarchical cluster analysis was performed using Statistica 10 software (StatSoft, Inc., 2011, www.statsoft.com).

3 Results and discussion

3.1. Spectrophotometric method

On figure 1 antioxidant capacity of sample 4 (PICKWICK) measured using ABTS method (during 6 hours) is shown. The measurements was performed after one hour from $t=0$ to $t=6$. Antioxidant capacity is almost unchanged during 6 hours of staying of individual infusions, but strogly depends on temperature of water.

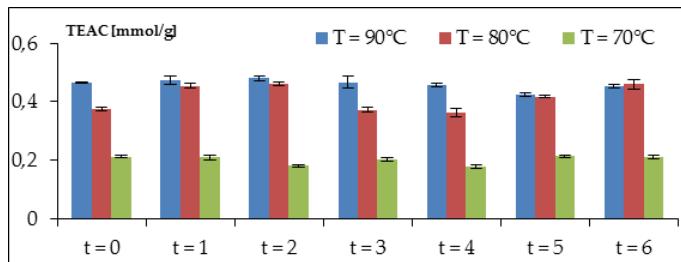


Figure 1: Antioxidant capacity of sample 4 (PICKWICK) during 6 hours

3.2. HPLC/MS analysis

The column Ascentis Express C18 was used for analysis of catechins in green tea. Optimized separation of catechins is shown on the figure 2.

The significant decrease of EGC and GCG content including their epimers and conversely significant increase of gallic acid and galloylquinic acid (galQ acid) was observed in infusions measured after 6 hours of staying of the infusion (figure 3). This degradation is observed even after one hour of staying of infusion.

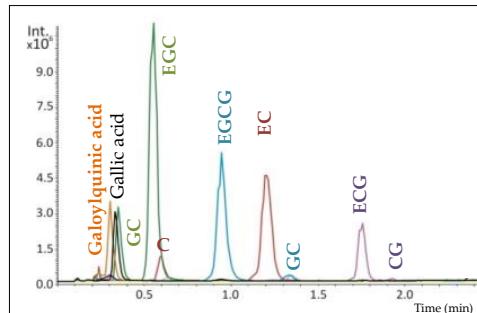


Figure 2: Separation of 24 phenolic compounds, **column:** Ascentis Express C18 (5 cm x 2,1 mm x 2 μ m), **mobile phase:** methanol (+ 0,1 % formic acid):water (+ 0,1 % formic acid), **temperature:** 40 °C, **flow:** 0,5 mL/min, **gradient:** 0 min – 20 % methanol, 2,5 min – 70 % methanol, MS/ESI-, SIM

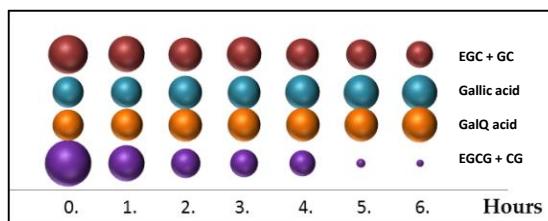


Figure 3: Degradation of catechin in green tea

3.3. Influence of storage

Influence of storage on content of catechins was measured during 14 weeks. The change of antioxidant capacity (AC) and total phenolic content (TPC) during storage of tea bags is shown on figure 4A. TPC is related to gallic acid as a standard and AC is related to the standard trolox. The figure 4B shows decreasing content of selected compounds. From this picture is obvious, that phenolic compounds are degraded during storage of tea bags.

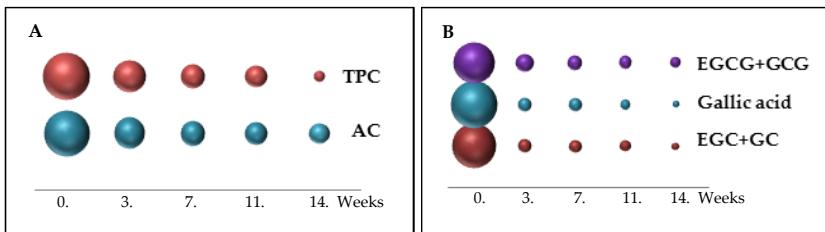


Figure 4: Influent of storage by (A) spectrophotometric method, (B) HPLC/MS

3.4. Statistical analysis

Hierarchical cluster analysis was applied in order to evaluate the difference between antioxidant capacity of the analyzed samples of green tea. The influence of degradation during staying of infusions for 6 hours and storage of tea bags was monitored. In case of degradation during 6 hours of staying of infusion two clusters and two outliers (S3 - Saga, S7 - Tesco) were found. Hierarchical cluster analysis was applied for influence of storage monitoring (Figure 5A), where one outlier was found. The outlier is sample 3 (Saga), which is packed in plastic box, whereas other samples are packed in paper box (Figure 5B).

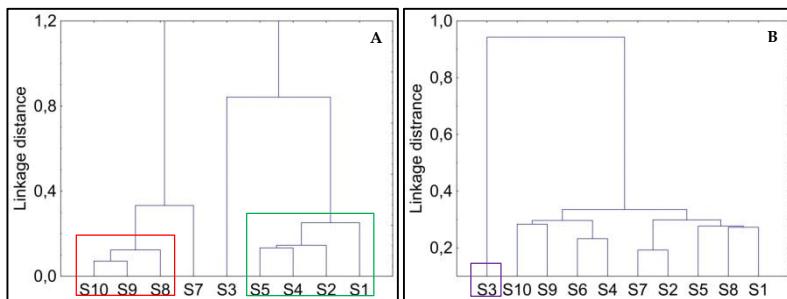


Figure 5: Hierarchical cluster analysis (A) for 10 samples during 6 hours in the same infusion (B) for 10 samples during 14 week

4 Conclusion

This work is focused on optimization of gradient elution in very short time. Catechins were separated in 2 minutes. This fast chromatographic separation was used to monitor degradation of catechins in infusions during their long time period of staying. Further, the influence of storage on catechin content was monitored. Staying of infusion for 6 hours causes the degradation of some catechins, probably to gallic acid. During few weeks of storage of tea bags, the content of important catechins has been also decreased. Together with HPLC/MS analysis, the antioxidant capacity and total phenolic compounds were measured using spectrophotometric techniques. The total antioxidant capacity remains unchanged, but contents of EGC and GCG (and their epimers) decrease. Using statistical analysis, two outliers (sample 3 and sample 7) was found.

5 References

1. Wang, H.; Hellierwell, K., Epimerisation of catechins in green tea infusions. *Food Chemistry* **2000**, *70*, 337–344.
2. Wang, Y.; Ho, C. T., Polyphenolic Chemistry of Tea and Coffee: A Century of Progress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57* (18), 8109–8114.
3. Jeszka-Skowron, M.; Krawczyk, M.; Zgola-Grzeskowiak, A., Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions: Influence of citric acid addition on extraction of metals. *J. Food Compos. Anal.* **2015**, *40*, 70–77.
4. Chen, J. L.; Xu, J.; Li, J. J.; Du, L. F.; Chen, T.; Liu, P.; Peng, S. S.; Wang, M. W.; Song, H. P., Epigallocatechin-3-gallate attenuates lipopolysaccharide-induced mastitis in rats via suppressing MAPK mediated inflammatory responses and oxidative stress. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *26* (1), 147–152.
5. Goh, R.; Gao, J.; Ananingsih, V. K.; Ranawana, V.; Henry, C. J.; Zhou, W. B., Green tea catechins reduced the glycaemic potential of bread: An in vitro digestibility study. *Food Chemistry* **2015**, *180*, 203–210.

Determination of metabolic flux of carbon source to pigment biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*

Jana Tkáčová, Tatiana Klempová, Milan Čertík

Department of Biochemical Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology
Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic
jana_tkacova@stuba.sk, milan.certik@stuba.sk

1 Introduction

Carotenoid pigments represent group of diverse natural pigments, which ensure typical colour of plants, microorganisms and some kind of animals. To these days, more than 700 carotenoids have been identified, representing C40 terpenoids with different number of double bonds, terminal structure and oxygen-containing function groups¹. Numerous researches have proved that their consuming provides health benefits resulting from antioxidant activity². Rate of antioxidant activity depends on cyclic structure of carbon chain³. Positive effects of carotenoids include protection against cancer, ischemic heart disease and eye disease. In addition, lycopene eliminates risk of prostate cancer⁴. Industrial application of pigments is widespread included pharmacy, cosmetics, food and feed industry. Demand for these biological active compounds enables application of microorganisms in commercial production due to their ability of pigment accumulation in high levels. Microorganisms producing carotenoid pigments are algae, bacteria, fungi and yeast⁴.

Microbial production of carotenoids could be regulated by various physiological conditions of cultivation media. Factors such as nature and concentration of carbon and nitrogen sources, minerals, vitamins, pH, aeration, temperature, light and stress have a major influence on cell growth and yield of carotenoids. Carotenoid biosynthesis is governed by the levels and activities of enzymes employed to the total carbon flux through the carotenoid synthesizing system. Because overall yield of carotenoids is directly related to the total biomass yield, to keep both high growth rates and high flow carbon efficiency to carotenoids by optimal cultivation conditions is essential in order to achieve the maximal pigment productivity⁵. (Aksu, Eren)

Oleaginous red yeasts are promising microbial sources for effective synthesis biosynthesis for carotenoids as well as lipids. Lipid accumulated in lipid bodies represents energy storage and β-carotene serves as protective compounds against environmental stress. Oleaginous microorganisms can accumulate intracellular lipids in their cells with storage capacity 20–70 % of lipids in dry cell mass⁶. However, as mentioned above, some

oleaginous microorganisms are also able to synthesize both lipids and carotenoid pigments in high yields. *Rhodotorula glutinis* is a typical microorganism for such dual production⁷ and it is the major pigment producer among *Rhodotorula* sp. species with predominant synthesis of β-carotene, γ-carotene, torulene and torularhodin^{4,8}.

According to Saenge et al. (2011)⁷ lipid and carotenoid synthesis requires medium with excess of carbon source and limitation of other nutrients, especially nitrogen source, despite of possible inhibition of cell propagation. In a fact, carbon and nitrogen ratio (C/N) of cultivation medium is one of the most important factors to control microbial production of lipid and carotenoid pigment. However, it is also necessary to consider initial concentration of carbon and nitrogen source to obtain enhanced metabolite production. Therefore, precise analysis of carotenoid formation under various C/N ratios is crucial for better understanding of pigment biosynthesis by *R. glutinis*. Various kinetics parameters have been calculated and consequences of metabolic flux of the carbon source to carotenoid pigments have been proposed.

2 Experimental

Red yeast *Rhodotorula glutinis*, characterized by both lipid and pigment production, was cultivated in YG medium with different carbon and nitrogen (C/N) ratios. We chose four C/N ratios: 20:1, 50:1, 70:1 and 100:1. We used glucose as a carbon source and yeast extract as a nitrogen source. Cultivation process proceeded 8 days, except the lowest C/N ratio 20:1 with 6 day cultivation.

After cultivation carotenoid pigments and lipids were isolated by extraction solution hexane: chloroform (2:1). Lipid content was determined by GC chromatography (GC-6890 N with FID detector, Agilent Technologies) and carotenoids were analyzed by high-performance liquid chromatography (HP 1100 with DAD detector, Agilent Technologies). Kinetic parameters were determined according to research of Certik and Shimizu (2000)⁹.

2.1 Results and discussion

Kinetic analysis was investigated for demonstration of metabolic flux of carbon source to carotenogenesis in yeast *Rhodotorula glutinis* in each growth phase. Therefore we defined various kinetic parameters. Product synthesis (v) represented average speed of biomass, lipid and pigment formation [$\text{g.L}^{-1}\text{.day}^{-1}$, $\text{mg.L}^{-1}\text{.day}^{-1}$]. Differential product synthesis (v_D) meant increase of biomass, lipid and pigment production in each day of cultivation [$(\text{g}_n - \text{g}_{n-1})\text{.L}^{-1}$; $(\text{mg}_n - \text{mg}_{n-1})\text{.L}^{-1}$]. Another kinetic parameter was specific rate of product synthesis (q), showed average speed of lipid and pigment accumulation in the biomass [% .day^{-1} ; $\text{mg.g}^{-1}\text{.day}^{-1}$]. Forth parameter was differential specific rate of product synthesis (q_D) represented actual daily increase of lipid and carotenoid pigment in the biomass [% $\text{n} - \%_{n-1}$; $(\text{mg.g}^{-1})_n - (\text{mg.g}^{-1})_{(n-1)}$].

Under low C/N ratio 20:1 the glucose was utilised after 72 hours of cultivation time and under C/N ratio the glucose was used after 144 hours of cultivation time. After glucose exhaustion we observed fast decrease in cell growth (Fig. 1C) and *R. glutinis* cells consumed intracellularly storage fatty acids as a secondary energy and carbon source. Such consumption of storage fatty acids especially under C/N ratios 20:1 and 50:1 (Fig. 1B) was accompanied with elevated pigment biosynthesis.

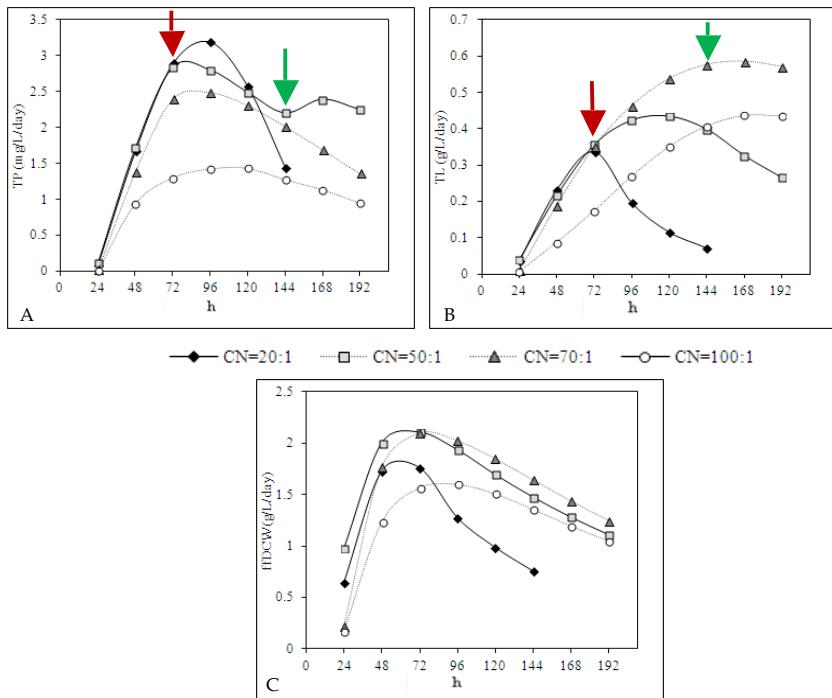


Figure 1: Kinetic parameter – product synthesis (ν) of (A) total pigment content (TP), (B) total lipid content (TL) and (C) fatty free dry cell weight (ffDCW)

Content of carotenoid pigments in cells was enhanced using lower C/N ratios. Results in Fig. 1A proved, that glucose exhaustion triggered carotenoid accumulation in the yeast. Decrease of lipid content is also associated with pigment biosynthesis. Fatty acids are degraded to acetyl-CoA through β -oxidation used as a substrate for mevalonate pathway, first branch of carotenoid pigments biosynthesis.

The question is which fatty acids are involved to pigment formation. It was found that reduction of oleic acid content from 51.9 mg/g DCW to 19.7 mg/g DCW under C/N ratio 20:1 was accompanied by rapid enhancement of carotenoid level in the yeast cells. The measured kinetic parameters proved the correlation between the metabolic flux of carbon from glucose to lipids and finally after glucose exhaustion from lipids (especially oleic acid) to pigments (Fig. 2A and 2B).

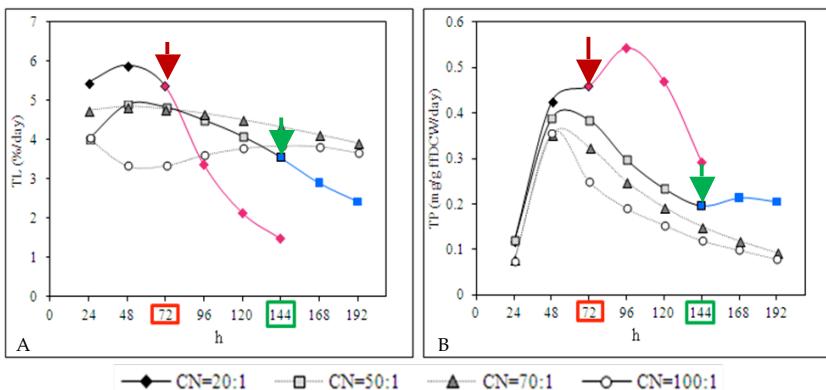


Figure 2: Kinetic parameter – specific rate of product synthesis (q) of (A) total lipid content (TL) and (B) total pigment content (TP)

4 Conclusion

In this research we confirmed connection among carbon starvation and biosynthesis of lipids and carotenoid pigments. Carotenoid formation is strictly associated to exhaustion of glucose as a primary carbon source. After glucose utilization from media red yeast *Rhodotorula glutinis* used intracellular fatty acids as a secondary energy and metabolic source where mainly oleic acid was probably used as a carbon source for carotenoid formation in *R. glutinis*.

Acknowledgement

The work was supported by grants VEGA 1/0574/15, APVV-0662-11, bilateral APVV project SK-CZ-2013-0167 and by the project "University Science Park of STU Bratislava" ITMS 26240220084

5 References

1. Jin, J. M., Lee, J., Lee, Y. W. (2010): Characterization of carotenoid biosynthetic genes in the ascomycete *Gibberella zeae*. FEMS Microbiology Letters, 302: 197–202.
2. Ye, V. M., Bhatia, S. K. (2012): Pathway engineering strategies for production of beneficial carotenoids in microbial hosts. Biotechnology Letters, 34: 1405–1414.
3. Mata-Gómez, L. C., Montañez, J. C., Méndez-Zavalaz, A., Aguilar, C. N. (2014): Biootechnological production of carotenoids by yeast: an overview. Microbial Cell Factories, 13: 1–11.

4. Frengova, G., Beshkova, D. M. (2009): Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 36: 163–180.
5. Aksu, Z., Eren, A. T. (2007): Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. Biochemical Engineering Journal, 35: 107–113.
6. Yen, H. W., Zhang, Z. (2011): Enhancement of cell growth rate by light irradiation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. Bioresource Technology, 102: 9279–9281.
7. Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T., Bourtoom, T. (2011): Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. Process Biochemistry, 46: 210–218.
8. Marova, I., Certik, M., Breierova, E. (2011): Production of enriched biomass by carotenogenic yeasts- application of whole-cell yeast biomass to production of pigments and other lipid compounds, biomass- detection, production and usage, Dr. Darko Matovic (Ed.), ISBN: 978-953-307-492-4, InTech.
9. Certik, M., Shimizu, S. (2000): Kinetic analysis of oil biosynthesis by an arachidonic acid – producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4. Applied Microbiology and Biotechnology, 54: 224–230.

Improving stability of co-amorphous drug system with addition of PVP

Irena Türkeová

Korbinian Löbmann, Vojtěch Enev, Thomas Rades, Martina Klucáková

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Materials Research Centre

Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic

email: xcturkeovai@fch.vutbr.cz

1 Introduction

Approximately 90% of small molecular weight drug candidates under development have poor aqueous solubility¹. This fact can be seen as one of the most pressing problems in drug research and development since most active pharmaceutical ingredients (API) are administered via the oral route, where dissolution in the gastric and intestinal fluids is one of the main prerequisites for the biological activity of any given API. Problems in finding an appropriate drug delivery system for poorly water soluble API can severely compromise the chance of the API to be further developed. Therefore, it is necessary to overcome problems associated with limited dissolution of an API in order to enable promising drug candidates to reach the patient⁶.

One of the most promising approaches in the development of drug delivery systems to improve the efficacy of new drugs is the conversion of a crystalline drug to its respective amorphous counterpart². However, the main drawback of the use of individual amorphous drugs is their physical instability during manufacturing, storage or administration with respect to their inherent tendency to recrystallize due to the fact that they are thermodynamically unstable³. One strategy to improve the stability of amorphous drugs is to incorporate them into amorphous polymers to create glass solutions⁴, which can be described as molecular mixtures of a drug and a hydrophilic polymer. The increased physical stability of these amorphous systems can be explained (at least in part) by their increased glass transition temperature (T_g), compared to the T_g of the pure amorphous drug, resulting from the frequently high T_g of the polymers.

However, this approach has severe drawbacks, mainly due to the commonly high hygroscopicity of the polymers. Water, acting as a plasticizer, will strongly lower the T_g of the glass solution, soften the amorphous mixture, increase molecular mobility within the glass, and thus increase the likelihood for crystallization of the drug. Another drawback of the use of polymers in glass solutions can be limited miscibility of the drug into the polymer. Thus, often large amounts of polymer are required for sufficient drug loading and this in turn leads to large bulk volumes of the final dosage form^{5, 6, 8}.

In this case we tried used aminoacid as stabilizer and PVP^{6, 7}. As drug we used Indomethacin - poorly water soluble BCS class II drug. Indomethacin is a nonsteroidal

anti-inflammatory drug (NSAID) that reduces fever, pain and inflammation. We tried to prepare co-amorphous mixtures with aminoacid and polymer and will see that is working, is stable or not.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Indomethacin (IND, $M=357.79\text{ g/mol}$) was purchased from Hawking, Inc. Pharmaceutical Group (Minneapolis, USA). The amino acids L-tryptophan (TRP, $M=204.23\text{ g/mol}$) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). As polyvinylpyrrolidon, was selected Kollidon VA 64 from BASF (The Chemical Company, Germany). All compounds were used as received.

2.1 Methods

Preparation of the amorphous form

Co-amorphous blends of drug, amino acid and PVP were prepared by vibrational ball milling. The ball milling samples were produced by placing a total mass of 500 mg of the crystalline compounds, or the appropriate amount of drug and amino acid at the molar ratio 1:1 with 0 %, 1 %, 2 %, 5 % of PVP, respectively, into 25 ml milling jars with two 12 mm stainless steel balls, and milling at 30 Hz for 90 min in an oscillatory ball mill (Mixer Mill MM400, Retch GmbH & Co., Haan, Germany), which was placed in a cold room (+6 °C).

X-ray powder diffraction (XRPD)

XRPD was performed using an X'Pert PANalytical X'Pert PRO X-ray Diffractometer (Almelo, Netherlands) using Cu K α radiation ($\lambda = 1.54187\text{ \AA}$). An acceleration voltage and current of 45 kV and 40 mA were used. Samples were scanned in reflection mode between 5° and 35° 2 θ /s and a step size of 0.0262606°. Data were collected and analysed using the software X'Pert Data Collector (PANalytical B. V., Almelo, Netherlands).

Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC measurements were performed on a Discovery DSC (TA Instruments, New Castle, DE, USA). Approximately 5 mg of sample was analysed in an aluminum Tzero pan sealed with an aluminum Tzero lid. Measurements were performed in modulated temperature mode in the temperature range from -20 to 180 °C with an applied heating rate of 2 K/min, modulation amplitude of 0.2120 °C, and a period of 40 s. A constant nitrogen flow rate of 50 mL/min was applied. Routine calibration of temperature and enthalpy was performed on an indium standard. Cell constant and Tzero calibrations were performed with sapphire. Analysis was performed using Trios software (TA Instruments-Waters LLC, New Castle, DE, USA). The T_g was calculated as the midpoint of onset and end temperature of three independent samples.

Physical stability

The co-amorphous mixtures were stored in desiccators under dry conditions (silica gel) at 40 °C and in desiccator under room temperature and 60 % relative humidity. Samples were repeatedly analysed by XRPD to investigate possible recrystallization of drug and amino acids.

3 Results

X-ray powder diffraction (XRPD)

Determination of Successful Amorphization by XRPD

Success in amorphization was determined by the detection of a halo as the only feature in the XRPD diffractogram. In Table 1 we can see that amorphization was success in all mixtures. Results are in figure 1, 2. In Figure 1 are XRPD diffractograms of the materials before and after ball mill. Tryptophan was amorphous but only after ball mill, his recrystallization started very quickly.

In Figure 2 are XRPD diffractograms of the materials after ball preparation by ball mill.

Table 1: Samples prepared by ball milling and the possible amorphization

Sample content	Molar ratio	Success in amorphization	Stability
IND	-	yes	Not stable
TRP	-	yes	Not stable
IND-TRP	1:1	yes	30 days (more)
IND-TRP + 1 % PVP	1:1	yes	30 days (more)
IND-TRP + 2 % PVP	1:1	yes	30 days (more)
IND-TRP + 5 % PVP	1:1	yes	30 days (more)

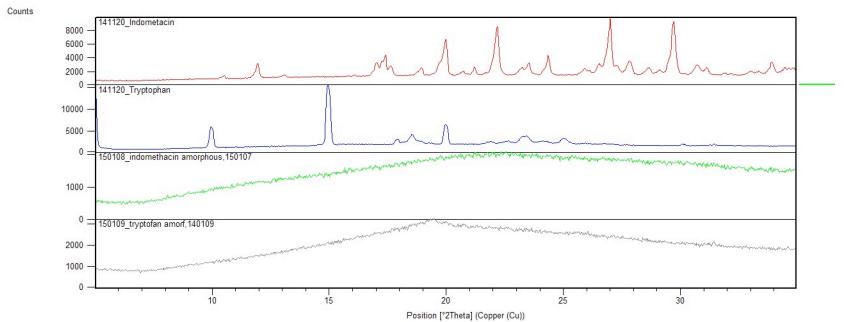


Figure 1: XRPD diffractograms of the materials immediately after preparation: a) individually components, individually components after ball mill.

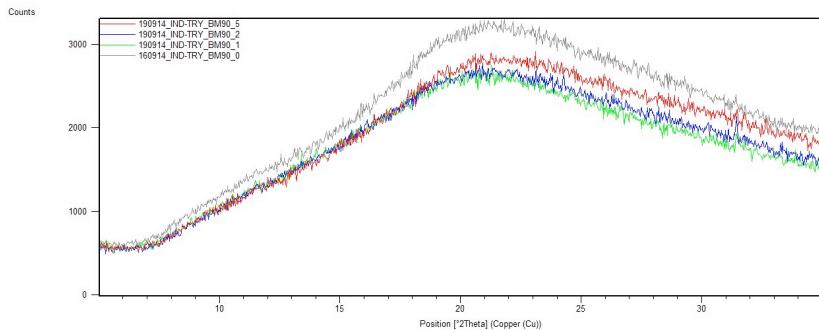


Figure 2: XRPD diffractograms of the materials immediately after preparation: co-amorphous IND mixtures after ball mill.

Physical stability

The co-amorphous mixtures were stored in desiccators under dry conditions (silica gel) at 40 °C and in desiccator under room temperature and 60 % relative humidity. Samples were repeatedly analysed by XRPD to investigate possible recrystallization of drug and amino acids.

Types of results are in figure 3, 4 after one month in desiccators. In XRPD diffractograms we cannot differences in diffractograms after preparation and after storage. All samples are still amorphous form.

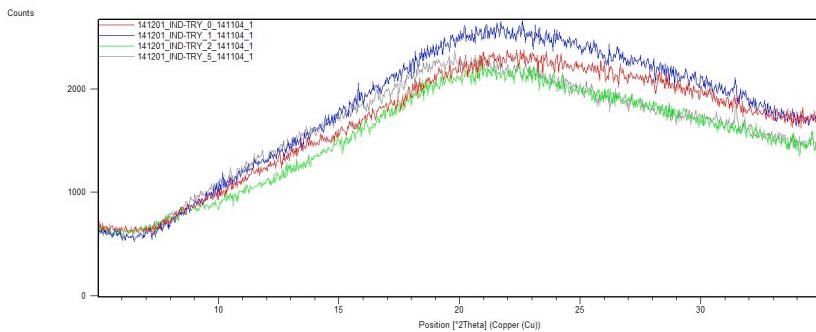


Figure 3: XRPD diffractograms from the stability study of the ball milled amorphous materials after 1 month storage in desiccator under 60 % RH at room temperature.

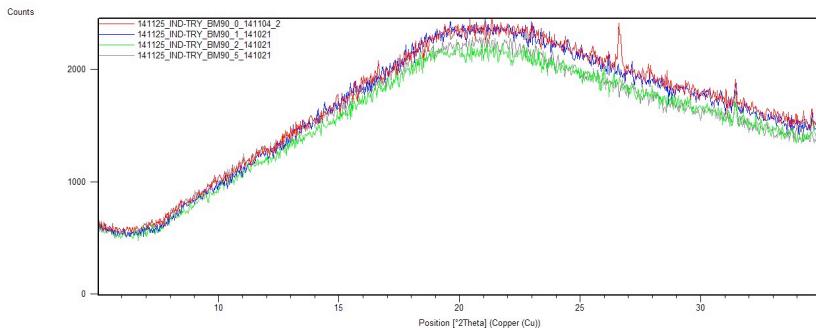


Figure 4: XRPD diffractograms from the stability study of the ball milled amorphous materials after 1 month storage in desiccator under dry conditions at 40 °C.

Differential scanning calorimetry (DSC)

The thermal properties of the samples were investigated by DSC. All co-amorphous mixtures revealed a single glass transition temperature (T_g) - Table 2 indicating that they are homogeneous. This means that all the compounds in the mixture are fully dissolved in each other. The T_{gS} of the amino acids was not possible because ball milling of the pure amino acids did not result in amorphization-only few minutes. In table 2 are glass transition for all samples. We can investigate that addition of PVP has good response, because with higher addition of PVP we have higher glass transition temperature. Indomethacin has also higher glass temperature in amorphous form in mixture than indomethacin in crystallization form.

DSC measurements, revealing a single T_g for all co-amorphous drug mixtures. Type of results is in the Fig. 5 IND, TRP + 2 % PVP mixture.

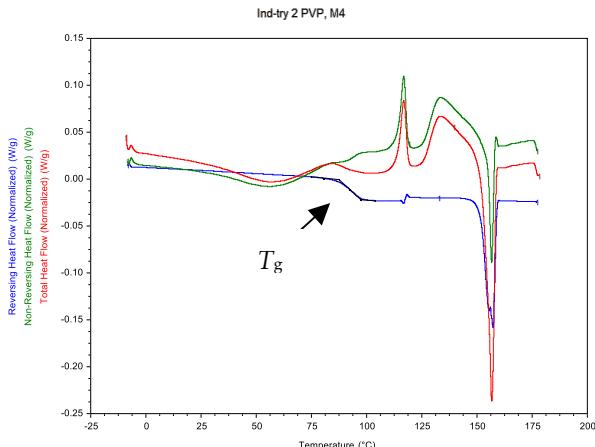


Figure 5: DSC thermogram showing the T_g of ball mill prepared IND, TRP + 2 % PVP mixture

Table 2: Experimental T_g s (with standard deviation) of the pure drugs and the co-amorphous binary and ternary mixtures in ratio 1:1

Sample content	T_g (°C)	Sample content	T_g (°C)
IND	41	IND-TRP + 1 % PVP	91,17
TRP	–	IND-TRP + 2 % PVP	91,52
IND-TRP	90,6	IND-TRP + 5 % PVP	92,11

4 Conclusions

In this study, mechanical activation ball milling was successfully applied to obtain co-amorphous mixtures of indomethacin and as stabilizers was used tryptophan and addition of PVP Kollidon VA 64. Formation of single phase co-amorphous mixtures with mixture ratio 1:1 (indomethacin + tryptophan) was detected by DSC. Glass transition increases with addition of PVP. Stability studies revealed increased storage stability that and showed that the most stable mixtures 1:1 with PVP were stable for over one months at all storage conditions. The improved compared to the amorphous physical mixtures stability can be attributed to the formation of an IND-TRY molecular mixture where aminoacid acts as a stabilizing component (anti-plasticizer), which is beneficial for stability even in the absence of molecular interactions.

5 References

1. HAUSS, D. J. Oral lipid-based formulations. Advanced Drug Delivery Reviews, May 2007, vol. 59, pp. 667–676.

2. AALTONEN, J., RADES, T. Towards physic-relevant dissolution testing: The importance of solid-state analysis in dissolution. *Dissolution Technologies*, May 2009, vol. 16, no. 2, pp. 47–54.
3. HANCOCK, B. C.; ZOGRAFI, G. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, January 1997, vol. 86, no.1, pp. 1–12.
4. KAUSCHAL, A. M., GUPTA, P., BANSAL, A.K. Amorphous drug delivery systems: Molecular aspects, design, and performance. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2004, vol. 21, no.3, pp. 133–193.
5. VASCONCELOS, T., SARMENTO, B., COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discovery Today*, December 2007, vo. 23, no. 24, pp. 1068–1075.
6. LÖBMANN, K.; GROHGANTZ, H.; LAITINEN, R.; STRACHAN, C.; RADES, T. Amino acids co-amorphous stabilizers for poorly water soluble drugs – Part 1: Preparation, stability and dissolution enhancement. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, March 2013, vol. 85, no. 3, pp. 873–881.
7. JENSEN, K. T.; LARSEN, F. H.; CORNETT, C.; LÖBMANN, K.; GROHGANTZ, H.; RADES, T. Formation mechanism of coamorphous drug-amino acid mixtures. *Molecular pharmaceutics*, June 2015, vol. 12, no. 7, pp. 2484–2492.
8. TAYLOR, L. S.; ZOGRAFI, G. Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions. *Pharmaceutical Research*, December 1997, vol. 14, no. 12, pp. 1691–1698.

Acknowledgement: This work was supported by project Nr. LO1211, Materials Research Centre at FCH BUT-Sustainability and Development (National Programme for Sustainability I, Ministry of Education, Youth and Sports).

*Sekce studentů doktorských
studijních programů*

*Tématický okruh anorganická chemie,
materiálové vědy a inženýrství*

Removable Parylene Based Barrier Multilayer for Corrosion Protection of Metallic Archaeological Artefacts

Lucie Blahová

Jakub Horák, Radek Přikryl, František Krčma

*Brno University of Technology, Faculty of Chemistry,
Institute of Physical and Applied Chemistry
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic
xcblahoval@fch.vutbr.cz*

Deposition of thin films as gas barrier protection of materials against external influences has become more and more utilized in recent years. Original research of these barrier coatings is connected to evolving space research and space flights in 1980s. Nowadays, knowledge gained in this field is used in various industrial applications such as microelectronics, food packaging, anticorrosion layers etc. It is an alternative way how to relatively fast and effectively save cultural heritage from corrosion destruction. The treatment of original archaeological objects needs many specific requirements. Protective coating used on archaeological items has to be removable through a soft simple technological procedure.

Based on our experience in recent work, parylene (poly-para-xylylene) was chosen as a suitable candidate for preparation of thin barrier films for this purpose. Parylene is characteristic by chemically inertness, conformity of the coating, transparency and excellent barrier properties. It is commonly used in wide range of industries, particularly in biomedicine and microelectronics. However it is not possible to remove parylene film directly without harming artefacts. One of the possible ways to solve this problem is to develop soluble interlayer between metal and parylene film.

The aim of this study is to prepare parylene coatings with the functional interlayer made of special silicone-acrylic lacquer Laksil. Parylene films were prepared via chemical vapour deposition method in so called Gorham process. The dip coating method was used for Laksil films preparation.

This study deals with deposition of the multilayer described above on iron, copper, brass and bronze model sample. Prepared layers were characterized by various methods to obtain information about their thickness (ellipsometry, profilometry), surface morphology of layers (SEM), barrier properties (Oxygen Transmission Rate measurements). Optical properties were determined using colouristic measurements in order to evaluate the influence of deposited multilayer on appearance of metallic samples. Standard corrosion tests were performed in a salt spray chamber to assess the effectiveness of corrosion protection of developed barrier multilayers. Photographic documentation of corrosion progress was created. It was found out that addition of Laksil interlayer resulted in significant improvement of barrier properties in comparison with parylene film itself.

Keywords: archaeological artefacts, metals, corrosion protection, parylene, thin films.

The author didn't submit the contribution before the proceedings deadline.

Applicability and characterization of High Power Deep UV LEDs for miniaturized portable analytical devices

Miloš Dvořák

Yan Li, Nantana Nuchtavorn, Pavel N. Nesterenko, Mirek Macka

*Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Food Science and Biotechnology,
Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic
czemid@gmail.com*

1 Introduction

Photometric detection in the deep-UV region (wavelengths bellow 300 nm) is of fundamental importance in detection and monitoring of numerous analytes in areas of (bio)chemical analysis, forensics, pharmaceutical, environment and other applications. Benefits of portability of analytical devices would be lost for systems dependent on bulky and heavy detection components. Especially in the area of optical detection, it is still a problem to source small and low cost but well performing commercial devices, compatible with miniaturized analytical apparatus. Recently new inexpensive, simple and robust deep UV LEDs became commercially available [1], which opened up new possibilities for design of portable absorption and fluorescence detectors for capillary flow-through techniques such as flow injection analysis (FIA), liquid chromatography (LC) and capillary electrophoresis (CE). The lowest wavelengths LEDs commercially available are at ~240 nm. This wavelength region below 250 nm has shown only a slowest progress. From the first use of a deep-UV LED (255 nm, only ca 15 µW) in an "in-house" on capillary detector in CE [2], next articles described to use the same kind of LED. These LED were very limited in their optical power, and had a very short lifetime. Recently a new generation of deep-UV LED based on different semiconductor materials emerged. This new generation of deep-UV LED has been demonstrated in a CE system and this work has been published this year [3]. In this work we present characterization test and use a newer line of LEDs, offering long lifetime and substantially higher optical power. Characterization of 255 nm and 280 nm deep-UV LEDs is detailed including a comparison with the older line deep-UV LED. Designs and applications are investigated, where those LEDs are incorporated into a simple low cost optical cell, in a high sensitivity Z-cell, or are combined with electrochemical detection. The detection designs are investigated with a modular flexible microfluidic platform used for miniaturized capillary LC [4].

2 Experimental

New generation of deep-UV LEDs based on AlN material with emission at 255 nm and 280 nm (OPTAN255H and OPTAN280J, Crystal IS, USA) was used. The obtained data were compared with the older generation of deep UV (UVTOP 255-HL, SETi, USA). LED spectra were recorded using a fiber optics CCD Spectrophotometer (OceanOptics 2000, USA). For the determination of radiometric power a silicon photodiode (UV-100, Roithner-Laser, Germany) was used. The voltage and current were measured by a multimeter (Tenma, USA). A performance test of the deep-UV LEDs incorporated in an on-capillary detector was realized with the help of a capillary alignment interface (Agilent, Germany), and a silicone photodetector (TOCON_ABC2, SgLux, Germany) was placed on the opposite site of the capillary in an in-house designed holder [1]. The signal from the photodiode was connected to a data acquisition system (eDAQ, Australia), connected to a PC. This detector was then tested with a modular miniaturized LC station. The performance of this optical detection is demonstrated in an isocratic separation of a mixture of parabens [4]. Hyphenated detection technique with end-capillary screen printed electrode (Pt/AgCl) in wall-jet arrangement of electrochemistry cell (FC2-WJ, BVT, Czech Republic) was tested. Further, usage of the deep-UV LED combined with high sensitivity Z-cell (Knauer, Germany) was tested.

3 Results and Discussion

The previous generations of deep-UV LEDs, called here also older line, suffered drawbacks in terms of their low optical power (in the range of μW), strong parasitic emission in the visible spectrum range and broader bandwidth for major emission wavelength. The differences in emission spectra between the old and new lines of deep-UV LEDs are shown in Figure 1.

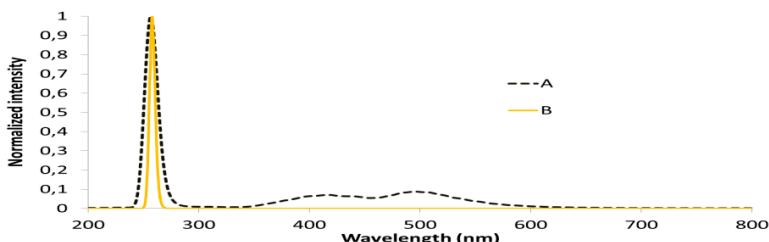


Fig. 1. Comparison of old (A) and new (B) emission spectra of deep-UV LEDs.

Other problems for the previous old line of deep-UV LED was their short lifetime and excessive heating. Relatively recently marketed new generation of deep-UV LEDs exhibit significant improvements in those key parameters. In this work we investigated optical characteristics of representatives of this new line of deep-UV LEDs, specifically with emission maxima at 255 and 280 nm. We tested their optical power (0.6 and 1.5 mW,

respectively) and emission spectra, showing a significant decrease in the visible parasitic emission bands. A summary of key parameters is shown in Table 1. The implementation of a deep UV absorbance detector into the miniaturised LC and FIA systems is shown. The short time baseline noise of was approximately 0.15 mAU, which is comparable with published literature. The hyphenation with electrochemistry end-capillary detection was successfully tested in FIA mode and it is visualized by injection of 4 nL 1.1 mM methylparaben in water/MeCN 50/50. Finally, a combination of 250 nm deep-UV LED with a high sensitivity Z-cell is demonstrated showing a satisfactory performance.

Table 1: Selected parameters of older (UVTOP255-HL) and newer (OPTAN255H) line of deep UV LEDs.

Parameters	OPTAN255H	UVTOP255-HL
Radiant power (mW)	0.57	0.014
Lifetime (Hours)	3 000	200
Prize (AUS\$)	300	700
Emission band width (nm)	11	25
Compounds	AlN	AlGaN

4 Conclusion

New generation of LEDs was used for in house designed on capillary photometric detector as a part of a portable capillary liquid chromatography system based on a microfluidic platform. The detector noise and sensitivity were satisfactory. The advantage in the field of new technologies opened a way for next generation of low cost LEDs operating in the deep UV area and having a longer lifetime and sufficient optical power for analytical use.

5 References

1. Johns C., Macka M., Haddad P. R., *Electrophoresis*, 2004, 25, 3145-3152.
2. Krcmova L., Stjernlof A., Mehlen S., Hauser P. C., Abele S., Paull B., Macka M., *Analyst*, 2009, 134, 2394-2396.
3. Bui D.A., Hauser P.C., *Journal of Chromatography A*, 2015, 1421, 203-208.
4. Li Y., Dvořák M., Nesterenko P.N., Stanley R., Nuchtavorn N., Krčmová-Kujovská L., Aufartová J., Macka M., *Analytica Chimica Acta*, 2015, 896, 166-176.

Acknowledgement:

ACROSS and School of Physical Science, University of Tasmania. Australian Research Council (ARC): Future Fellowship Level 3 (Professorial) (FT120100559).

Parylene C and SiO_x bilayers for archaeological artefacts preservation

Jakub Horak

Michal Prochazka, Lucie Blahova, Frantisek Krcma

Brno university of technology, Faculty of chemistry,

Institute of Physical and Applied Chemistry

Purkynova 464/118, 612 00, Brno, Czech republic

xchorakj@fch.vutbr.cz

A lot of metallic archaeological artefacts is suffering because of an inappropriate protection and bad storage conditions in museums. That is why there is an intention to develop a procedure that will secure these objects better. There is an effort to prepare protective layer with good barrier properties in order to stop creation of corrosion centers and the corrosion propagation as well. Material for those applications must be easily removable (e.g. for later analysis) and transparent (for later exhibition). There is also a requirement that the treatment must not harm the sample or sample surface.

According to our experiments and literature research, poly-paraxylylene based film (type Parylene C) deposited on metallic substrates by Chemical Vapour Deposition was chosen as promising material for archaeological artefacts preservation. Parylene C films have great barrier properties but its hardness and mechanical resistance are inadequate especially during manipulation.

Therefore our work is focused on deposition of an additional protective hard coating layer based on SiO-like coating for improving mechanical properties with conservation of its barrier properties. The optimization of thin film preparation process was carried out in order to obtain functional protection system.

Keywords: Parylene, CVD, PECVD, barrier properties.

The author didn't submit the contribution before the proceedings deadline.

Flame Retardants and Their Occurrence in the Terrestrial Ecosystem

Václav Chytíl

Milada Vávrová

*Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection
Závodní 1456, 687 25 Hluk
xcchytilv@fch.vutbr.cz*

1 Introduction

Flame retardants are compounds added to manufactured materials, such as plastics and textiles, and surface finishes and coatings that inhibit, suppress, or delay the production of flames to prevent the spread of fire. This study was focused on the analysis of four compounds from a brominated flame retardants group. Pentabromoethylbenzene (PBEB), hexabromocyclododecane (HBCD), hexabromobenzene (HBB) and tetrabromobisphenol A (TBBPA) are primarily used in wide range of polymeric materials, textiles and wood products. In addition, bisphenol A (BPA) was also measured. This compound does not directly belong to the BFRs group but it is a starting substance for production of TBBPA and its derivatives. General use of this substance is in production of various polycarbonate materials and epoxy resins.

2 Experimental

Matrices were represented by four soil samples and four seats of fire samples. First sampling site was chosen on the basis of the fire in the industrial area near Chropyně, where many plastic products are made. Also a warehouse with plastic materials for recycling burnt down in 2011. Fourth sampling point was chosen in Záříčí village, on the land behind the gardens. Smoke from the fire in the industrial area diffused in the opposite direction so this place should be appropriate for comparison. Relative position of these 2 sampling sites is about 2.5 km as the crow flies. For the comparison of abundance of target compounds in directly and indirectly contaminated soils, four samples from various seats of fire were analyzed.

Analytical method development consisted of many optimizations. Three various extraction techniques were tested, each in different conditions. Pressurized solvent extraction had the best efficiency for most of the target compounds. Stability in strongly acidic conditions was also tested. Recovery was higher than 70 % for all of analytes, so sulfuric acid treated silica gel was tried for the clean-up of the extracts. Later it showed

that neither acidic nor basic silica gel is appropriate and neutral form is sufficient. In the case of eluting solvents the need of slightly polar one was discovered.

Standards were prepared in two different solvents and better solubility for most of the analytes was proven in toluene. BPA and TBBPA had to be derivatized prior to gas chromatographic determination. Acetic anhydride in pyridine was selected as derivatizing agent. On the basis of detection limits, gas chromatography with electron capture detection was chosen as an appropriate analytical tool for the determination of BFRs. On the other hand, BPA was determined by gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection.

Whole analytical process was three times repeated for each sample and in the graph below (Figure 1) there are mean values for concentrations in dry matter of samples taken near the industrial area in Chropyně. „t“ at HBCD means „total“ or the sum of three isomers of this compound. The highest amount of all determined compounds was proven in sample no. 2 which was represented by the soil from Chropyně. TBBPA was not detected in any of these samples that is why it is not shown in the graph.

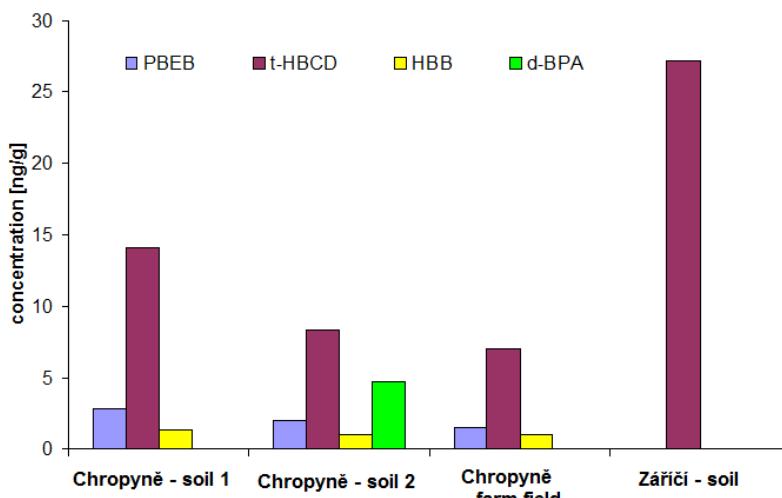


Figure 1: Graph of mean values for concentration in dry mater (ng/g) of samples taken near the industrial area

Samples from the seats of fire were analyzed the same way as those from Chropyně. The most contaminated sample was from the seat of fire of Melicharka restaurant in Brandýs nad Labem (Figure 2). On the contrary, the least contaminated place was the forest burnt-out area near Velmovice. TBBPA was not detected in this series of samples (either).

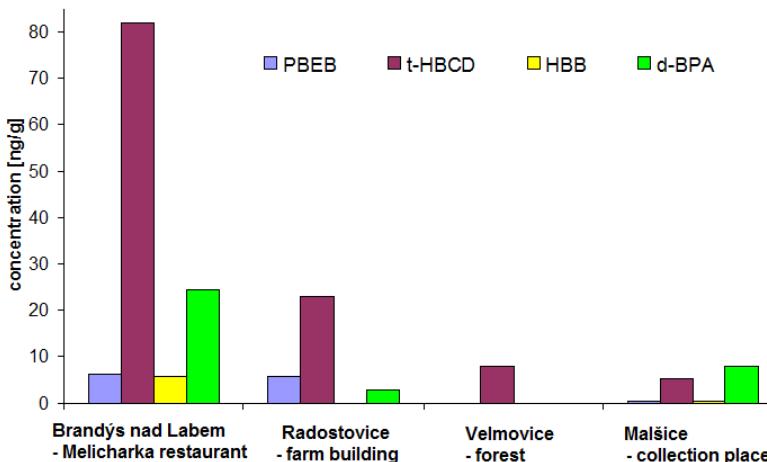


Figure 2: Graph of mean values for concentration in dry mater (ng/g) of samples from various seats of fire

4 Conclusion

We reached a conclusion that the most abundant analyte was the hexabromocyclododecane which was quantified in all matrices in the range of 7.018-81.88 ng/g dry weight. On the contrary, tetrabromobisphenol A was not proven in any of analyzed samples. The ash from the Brandýs nad Labem restaurant fire contained the highest amount of all target compounds (total 118.2 ng/g dw). The least contaminated place was the forest burnt-out area near Velmovice (hexabromocyclododecane only, 7.843 ng/g dw). As for soil samples, greater concentrations were found in the area near the industrial site in Chropyně, where a store of plastic materials burnt down in 2011. The analysis of the seat of fire samples showed that compounds of interest are more abundant in ash than in a soil part (some of them were mixtures of ash and soil). All measured concentrations fall within a range in which these analytes are present at many other places in the world (tenths to tens ng/g dw)^{1,2,3,4}.

5 References

- COVACI, Adrian, Stuart HARRAD, Mohamed A.-E. ABDALLAH, Nadeem ALI, Robin J. LAW, Dorte HERZKE a Cynthia A. DE WIT. Novel brominated flame retardants: A review of their analysis, environmental fate and behaviour. *Environment International* [online]. 2011, vol. 37, issue 2, s. 532-556 [cit. 2015-11-17]. DOI: 10.1016/j.envint.2010.11.007. Link: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412010002370>

2. BARCELO, Damia a Ethel ELJARRAT. *The Handbook of Environmental Chemistry: Brominated flame retardants* [online]. Springer Berlin Heidelberg, 2011, 290 p. [cit. 2015-11-17]. ISBN 978-3-642-19268-5. Link: <http://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-642-19269-2>
3. SCHLABACH, Martin et al. *Brominated Flame Retardants (BFR) in the Nordic Environment* [online]. Copenhagen: Nordic Council of Ministers, 2011 [cit. 2015-11-17]. ISBN 978-92-893-2221-8. Link: <http://www.nordicscreening.org/index.php?module=Pagesetter&type=file&func=get&tid=5&fid=reportfile&pid=15>
4. SÁNCHEZ-BRUNETE, Consuelo, Ester MIGUEL a José L. TADEO. Determination of tetrabromobisphenol-A, tetrachlorobisphenol-A and bisphenol-A in soil by ultrasonic assisted extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2009, vol. 1216, issue 29, s. 5497-5503 [cit. 2015-11-17]. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.05.065.
Link: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309008280>

Acknowledgement:

This study was supported by the project No. FCH-S-14-2487 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

Study of AgNPs or AuNPs Interactions with Skin Layers by IR and Raman Spectroscopy

Adéla Jeništová
Marcela Dendisová, Pavel Matějka

University of Chemistry and Technology Prague, Faculty of Chemical Engineering,
Department of Physical Chemistry
Technická 5, Praha 6 - Dejvice, 166 28
adela.jenistova@vscht.cz

1 Introduction

Skin is the largest organ of the body^{1, 2, 3}. It forms important natural barrier between the body and external environment. Hence, skin plays a key role in the defense against pathogens and excessive water loss⁴. The structure of human skin is very similar to the structure of pig skin (PS)^{5, 6}. Therefore, in this work the PS was used as a model of the human skin. The skin structure is divided into three main parts – *epidermis*, *dermis* and *subcutis*. The epidermis forms the uppermost part of the skin and consists of stratified epithelial squamous cells, predominantly from corneocytes (95 %). The uppermost layer of epidermis, *stratum corneum* (SC), is formed by dead, fully keratin cells, whose cell membrane is replaced by ceramides, the substances with lipid character^{4, 6, 7, 8}. SC is the main barrier for permeation of substances through the skin primarily due to the structural arrangement and extending of the lipid layer. For monitoring of substances permeation many factors have to be considered, e. g. particle size and its distribution, shape and polarity of particles, hydration and the age and condition of the skin diseases^{4, 9}.

Infrared (IR) absorption and Raman scattering are noninvasive optical effects, which have been used for *in vivo* and *in vitro* studies of the skin for several years¹⁰⁻²³. These methods of vibrational spectroscopy have been used in various biological and medical applications, e.g. it has been applied for the identification of the skin diseases such as psoriasis^{11, 12}, atopic eczema^{13, 14} or melanoma^{15, 16}, monitoring of the drugs permeation/transport through the skin^{17, 18}, to describe the wound healing process¹⁹ or early diagnosis of skin cancer²⁰. Both methods are challenging e. g. to study the penetration of drugs through the skin or for analysis of substances contained in the skin surface (water content measurement^{21, 22}, determining the structure of ceramides^{2, 23}, or detection of melanin¹⁹).

The healing effects of gold or silver nanoparticles (AgNPs/AuNPs) are already known from ancient times^{10, 24, 25, 27}. The evident interest in the use of these nanoparticles (NPs) for cure the skin diseases, better penetration of drugs and reduction of side effects

in recent year increases considerably^{10, 24, 25, 26, 27}. AgNPs, due to their antiseptic properties, are widely used in creams, textiles, local medicines or surgical prostheses^{10, 26, 28}. Regarding AgNPs deposition in the dermis they cannot get into the systemic circulation and therefore should not affect any organs^{25, 28}. On the other hand AuNPs are carriers with anti-inflammatory properties useful for targeted drug delivery. One of the most attractive features of AuNPs is their interaction with thiols which provide effective and selective control of intracellular release. AuNPs can be used as transdermal or oral drugs carriers^{24, 29}.

In this work, besides of pure basic ointment (BO) or NPs-modified BO, B group vitamins thiamine (B1) and pyridoxine (B6), were selected to study their penetration through the skin. Vitamin B1 or its derivate is used for treating or preventing diseases due to inhibition of amine oxidase enzyme. Vitamin B1 has many uses especially in the treatment of skin inflammatory diseases (contact dermatitis, atopic dermatitis or psoriasis)³⁰. Vitamin B6 is essential for skin development and maintenance, and, moreover, exhibits protective roles in cardiovascular disease, diabetes or colon carcinogenesis³¹.

2 Experimental

2.1 Materials

Silver nitrate (AgNO_3 , Sigma Aldrich), sodium borohydride (NaBH_4 , Fluka Analytical), trisodium citrate dihydrate (Merck), potassium tetrachloroaurate (KAuCl_4 , Sigma Aldrich), thiamine hydrochloride (Sigma Aldrich) and pyridoxine hydrochloride (Sigma Aldrich) were analytical grade and used without further purification. All aqueous solutions were made using ultrahigh purity water purified using a Milli-Q® system. Samples of PS from pig ears were provided by Institute of Chemical Drugs, University of Veterinary and Pharmaceutical Science, Brno. Skin pieces with the size about 2×2 cm were stored in the freezer at less than -18°C and were used immediately after defrosting. In this study Leciderma Shea Neutral from company Original ATOK was used as a basic ointment (BO).

2.2 Methods

UV-Vis absorption spectra were measured in a quartz cuvette (5 mm) by GBC Cintra 404 spectrophotometer (wavelength 300 – 800 nm, recording speed 300 nm/min, spectral slit width 2 nm). IR reflectance spectra were collected by Nicolet FT-IR 6700 (Thermo Scientific, USA) spectrometer with ATR adapter (MIRacle, PIKE Technologies, USA), with ZnSe crystal. The IR 4 cm^{-1} resolved spectra were results of 128 scans (zero filling 0) acquired under control of the software Omnic 8.1. Raman 4 cm^{-1} resolved spectra were collected by FTIR spectrometer Equinox 55 (Bruker) with Raman module FRA 106/S (Bruker) accumulating 128 and Nd:YAG laser (1064 nm) using the software Opus 6.5.

2.3 Preparation of Standard and “Green” NPs

- Reduction of AgNO₃ by NaBH₄ was used to prepare AgB_NPs³².
- Reduction of AgNO₃ or KAuCl₄ by sodium citrate was used for preparation of AgC_NPs³³ and AuC_NPs³⁴.
- “Green” synthesis of NPs was examined using following reducing agents: amylose³⁵, gelatin³⁶, D-glucose (D-Glu)³⁷, ascorbic acid (AA)³⁸.

2.4 Preparation of Creams with NPs

Prepared NPs were centrifuged (14 000 rpm, 20 minutes), and mixed in the BO in weight proportions 1:1, 3:1 and 5:1 (amount of BO : amount of NPs). Thus, nine series of modified BO with NPs were examined further: three series of BO with AgB_NPs addition (e.g. AgB_1:1), three series of BO with AgC_NPs addition (e.g. AgC_3:1) and three series of BO with AuC_NPs addition (e.g. AuC_5:1) were prepared. For the study of vitamins penetration vitamins B1 and B6 were selected. Each vitamin was mixed with the BO in the weight proportion 20:1 (BO : vitamin, for mixture of the B1 and BO abbreviated BO_B1, for mixture of the B6 and BO abbreviated BO_B6). AuNPs in weight proportion 1:1 or AgNPs in weight proportions 1:1 and 3:1 (e.g. AgB_1:1_B1, AgC_3:1_B6) were mixed to this creams in the same manner as in the case of the original BO. In the case of “green” NPs, only the weight proportion 3:1 (BO : NPs) was used consistently. Immediately after mixing, all creams were applied to the defrosted untreated PS surface at laboratory temperature.

2.5 Measurement of IR and Raman Spectra and their Statistical Evaluation

A defrosted untreated sample of PS was fixed to the clean ATR crystal, firmly pressed by the pressure apparatus and closed with a cap because of prevention the variation of CO₂ and humidity during measurement. One series of spectra was recorded during two hours with five minutes intervals between each measurement (25 spectra in one series). In the case of treated samples of PS a thin film of the prepared cream was applied to the untreated temperate PS surface. Subsequently, the samples were examined as in the case of the untreated PS. Raman spectra of both treated and untreated PS were collected similarly during two hours.

All the measured IR spectra were corrected using the reference spectra of humidity and CO₂. IR spectrum of water was subtracted only from IR spectra of treated PS because of the water rest in centrifuged NPs. Then all the corrected IR spectra were normalized to absorbance value from 0 to 1 due to the contact variability between ATR crystal and sample. In the case of Raman spectra, a reference Raman spectrum of untreated PS was subtracted from all Raman spectra of treated PS. Processed Raman spectra were further normalized in the same way as IR spectra.

Normalized spectra were evaluated by multivariate statistical methods namely Partial Least Squares (PLS) regression, Principal Component Analysis (PCA) and Soft Independent Modelling of Class Analogy (SIMCA). Non-normalized spectra were used to study spectral changes (of both band intensities and band shifts).

3 Results and Discussion

3.1 IR and Raman Spectrum of Untreated PS

IR spectrum of untreated PS exhibit strong bands of amideic vibrational modes (1630 cm^{-1} , 1552 cm^{-1} , 1091 cm^{-1}) which are assigned to the high content of keratins (95 %) situated in SC. Characteristic bands of CH_3 - and $-\text{CH}_2$ - functional groups (2922 cm^{-1} , 2852 cm^{-1} , 1453 cm^{-1}) belong to the saturated aliphatic skeletons and their occurrence is caused evidently by the contribution of aliphatic chains in keratins and ceramides as constituents of SC. A presence of the band attributed to OH- stretching vibrational modes (3513 cm^{-1}) is the result of overlapping features of evident amount of water in cuticle and the presence of the epidermal cutaneous polymeric pigments of melanin rich in the OH-groups. Finally, the further apparent bands assigned to (partially unsaturated) fatty esters (1745 cm^{-1} – could be also enhanced by overlap with vibration of melanin, 1240 cm^{-1} , 1161 cm^{-1}) are observed in the spectrum of PS.

In the case of Raman spectrum of PS, only strong spectral features of saturated aliphatic skeletons (2936 cm^{-1} , 2849 cm^{-1} , 1449 cm^{-1}) and an evident band of amide group (1657 cm^{-1}) were observed.

3.2 Band Shifts in IR Spectra caused by NPs Addition

From unprocessed spectral series, average spectra and spectral records of variance were calculated. No apparent band shifts were observed comparing spectra of untreated PS with PS treated only by BO. However, addition of NPs caused evident band shifts especially in the case of AgB_1:1, AgB_3:1 and AuC_1:1. Significant band shifts exceeding 8 cm^{-1} are summarized in the table 1. The largest spectral shifts (above 10 cm^{-1}) were observed for C = O stretching modes of amide groups (for AgB_1:1 and AgB_3:1) and in deformation modes of CH_2 group (only for AgB_1:1 and AuC_1:1). These shifts correspond to the AgB_NPs (1:1, 3:1) or AuC_NPs (1:1) interactions with the lipid and keratin components in the SC. A lower quantity of NPs had no apparent effect on the shifts of vibrational bands which means there were no significant interactions between SC and NPs. In the case of AgC_NPs no interactions were observed at all.

Table 1: Spectral shifts of some characteristic vibrational bands caused by NPs addition

Spectral shifts from BO [cm^{-1}]	AgB_1:1 [cm^{-1}]	AgB_3:1 [cm^{-1}]	AuC_1:1 [cm^{-1}]	
1630	v(CO) – amide I	1641	1640	/
1552	$\delta(\text{NH})$ – amide II	1544	1543	/
1453	$\delta(\text{CH}_2)$	1467	/	1463

3.3 IR Spectral Effect of Addition of Different Type/Quantity of the NPs

For the investigation of the spectral time dependence, the areas assigned to the vibration modes of amides I and II (1640 cm^{-1} , 1544 cm^{-1}), ester carbonyl (1744 cm^{-1}), saturated aliphatic skeleton (1460 cm^{-1}) and OH-vibrations (1400 cm^{-1}) for BO and all BO modified by NPs were calculated in the program OMNIC 8. The comparison graphs are shown in the figure 1. for amide bands of the pure BO and the BO with different types of

the NPs (a) and the BO with different quantity of the AgB_NPs (b). It is evident, that not only type of the NPs, but also different quantities of added NPs plays a key role for the modification of the skin penetration. The graph a) demonstrates how the type of the NPs influences the penetration process. In the case of using AgB_1:1 there is the minimum intensity/area already after 60 minutes, whereas in the case of the AgC_1:1 is the minimum after 85 minutes and for the AuC_1:1 it corresponds to 110th minute. The graph b) shows how the amount of added NPs influences the penetration. As it was mentioned above; the system AgB_1:1 had minimum intensity after 60 minutes. AgB_3:1 reaches minimum intensity at 85 minute and in the case of the AgB_5:1 even after two hours of the measurement we do not observed the limit of the intensity decrease to the minimum.

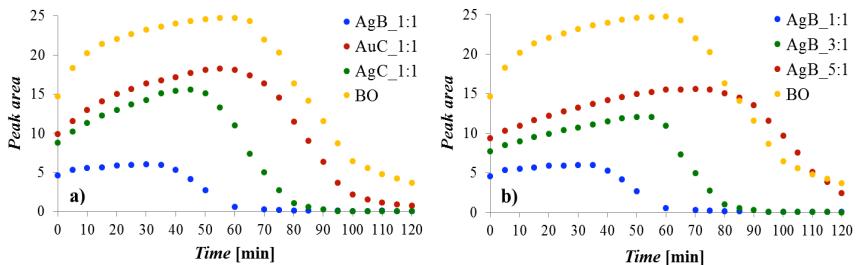


Figure 1: The time courses of amide bands a) for different types of NPs, b) for different amount of NPs in BO; compared with pure BO

Besides the previous results, the spectrum of the BO two hours after treatment the PS was compared with the spectra of the BO modified by different types of the NPs also after two hours after application to the PS. The biggest penetration enhancement occurred in the case of AgNPs especially in the weight ratios 1:1. The decrease of the NPs amount in the BO caused an evident reduction in the penetration, but in all cases the effects of the presence NPs were perceptible. A comparison of the BO and BO with NPs in the ratio 1:1 is shown in the figure 2. It is evident, that the presence of the NPs enhances the penetration of the substances from BO to the skin. As has been written above, the most prominent effect to the penetration is exhibited by AgNPs. The area of the stretching and deformation OH-vibrations (1) become almost a zero value. In the case of AgB_1:1 only vibration bands of the aliphatic skeleton are observed (3). In the spectrum of AgC_1:1, in the addition to the aliphatic skeleton, also vibrations of the amides (2) and carbonyl from the unsaturated esters (4) are apparently visible. AuC_1:1 also enhances/supports the penetration, but to a significantly less extent than AgNPs.

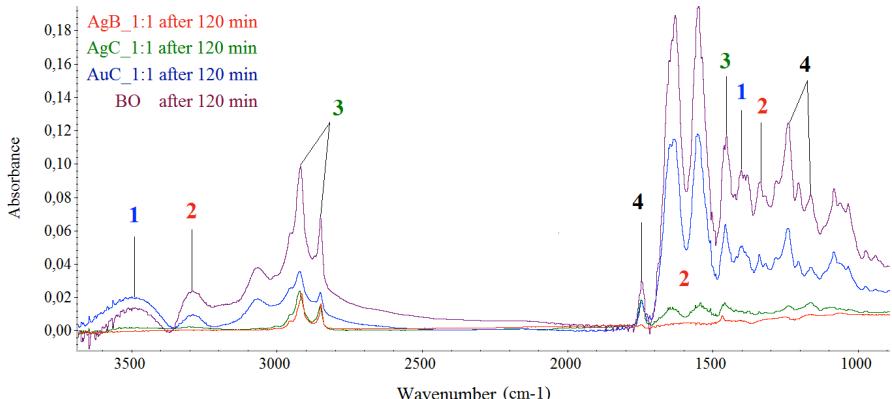


Figure 2: The comparison of the IR spectra of BO and BO modified by NPs (ratio 1:1) two hours after treatment. 1 – OH-vibrations, 2 – amides (I, II and III), 3 – aliphatic skeleton, 4 – unsaturated esters

3.4 Pyridoxine and Thiamine Penetration

In the next step, the vitamins B6 or B1 were added to the BO and to the BO modified by AgNPs in the weight ratios 1:1 and 3:1 and AuNPs in the weight ratio 1:1. Addition of these vitamins caused spectral evidence of the bands typical for each of the vitamins. The characteristic IR bands for B6 are 1274 cm⁻¹ and 1211 cm⁻¹, for B1 1382 cm⁻¹ and 1048 cm⁻¹. In the case of B6, the minimum intensity/area of its peaks was reached after 115 minutes, 85 minutes and 95 minutes for BO_B6, AgC_1:1_B6 and AgC_3:1_B6, respectively. In the case of B1, the minimum intensity/area of its peaks was observed after 110 minutes, 65 minutes and 85 minutes for BO_B1, AgB_1:1_B1 and AgB_3:1_B1, respectively. The addition of the AgNPs caused the acceleration of the vitamins permeation to the PS. AgB_NPs accelerated penetration of the B6 for 20 minutes (3:1) and 40 minutes (1:1), of the B1 30 minutes (3:1) and 50 minutes (1:1). AgC_NPs accelerated penetration of the B6 for 15 minutes (3:1) and 25 minutes (1:1) and of the B1 for 25 minutes (3:1) and 35 minutes (1:1). The addition of AuNPs caused acceleration of penetration just 10 minutes compared to pure BO. Figure 3 presents spectra of the B6 (a) and B1 addition (b) with marked characteristic IR bands for each vitamin. All spectra were obtained two hours after treatment. It is evident that characteristic vibrational bands of vitamins in the BO with AgNPs exhibit lower intensity than the corresponding bands for the BO without NPs. These results confirm that AgNPs significantly enhance the penetration.

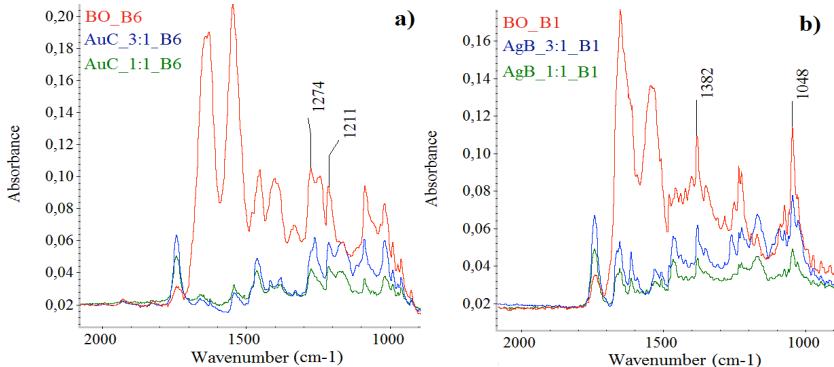


Figure 3: IR spectra marked by characteristic vibrational bands for a) B6, b) B1 acquired 120 minutes after treatment of pure PS

3.5 Multivariate Statistical Evaluation of IR and Raman Spectra

The PLS regression method gives a possibility of time prediction for the kinetic measurement of IR spectra. Reliable kinetic models were found for individual types of penetration experiments. The figure 4 shows the time prediction for IR spectra of AgB_3:1 system, which shows that experimental time is almost identical with the predicted time. In all other cases of IR and Raman kinetic spectral series the PLS models were similar.

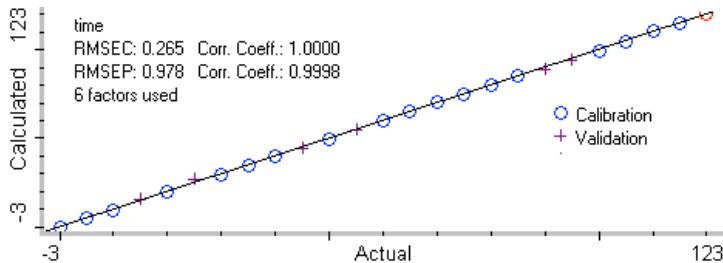


Figure 4: Time prediction (e.g. AgB_3:1)

Arrangement of the data along the principal components (PCs) shows the distances of the individual spectra for each of the series to PC1 and PC2. A score plot is given in the figure 5 which is typical for all IR spectral series of NPs-modified BO. The course of the score values can be divided into three main parts (marked I, II and III). In the first part (from 0 minutes to 70 minutes) data are arranged rather along PC2 and they are almost undifferentiated. In the second part (from 70 minutes to 100 minutes), the spectral data are arranged evidently along PC1. This part of the score graph corresponds to the main part of the penetration process; data are extremely well differentiated due to the larger distances of the points related to very significant and systematic changes in the spectra. The last part (III - from 100 minutes to 120 minutes) shows that points are arranged mainly along PC2 again, but they are still very well differentiated. The more successful

penetration of the substances from BO to the skin leads generally to the greater differentiation of the individual spectra in the time evolution.

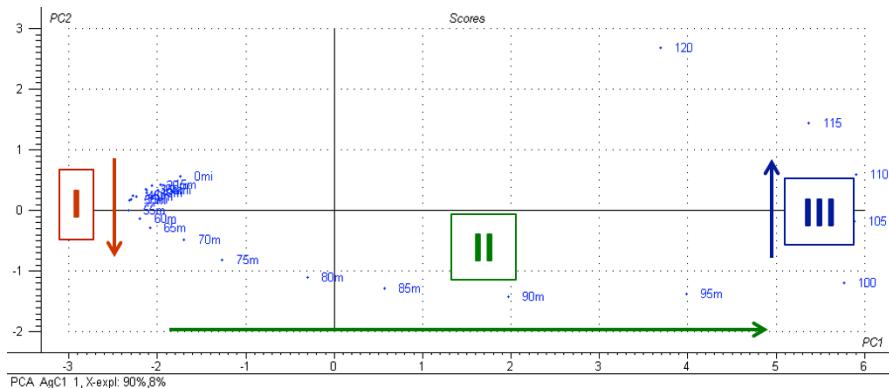


Figure 5: Arrangement of the data along the principal components for IR spectra; I – the first part, II – the second part, III – the third part (numeric value represents time in minutes)

Calculated PCA models of PS, BO and each type of the NPs mixed into the BO were used for a classification by multivariate method SIMCA. The classification revealed that the IR spectra of PS and pure BO are reliably recognizable from the spectra of BO with NPs. The IR spectra of the NPs in BO in weight ratios 1:1 and 3:1 are distinguishable from each other too. However, IR spectra of AuC_5:1 are recognizable in the time frame up to 60 minutes after application to the PS while the series of AgNPs (5:1) from 90 minutes after treatment. Using the parameter "discriminant power", spectral bands were investigated, which contributed to the mutual resolution of two classes/series of the spectra. Individual series differ by characteristic bands in the range of saturated aliphatic skeleton, carbonyl and OH-group. AuC_1:1 differs from other series also by bands attributed to C=C double bonds. The results from SIMCA show, that the effect of NPs addition into the BO is observable especially in the weight ratios 1:1 and 3:1, at lower amounts of NPs the spectra are interchangeable with spectra of other series corresponding to low contents of NPs.

In the case of Raman spectra, grouping of spectral series along PC1 and PC2 is shown in the figure 6. Compared to IR spectra only a few series of Raman spectra were differentiated; the blue circle belongs to Raman spectra of untreated PS, the red ellipsoid and the green one involve Raman spectra of PS treated by BO with addition of AgNPs and AuNPs prepared by AA as a reducing agent and the orange ellipsoid relates to Raman spectra of PS treated by BO with addition of AgNPs reduced by D-Glu. All undifferentiated spectra are situated almost along PC2. These results were confirmed by SIMCA analysis.

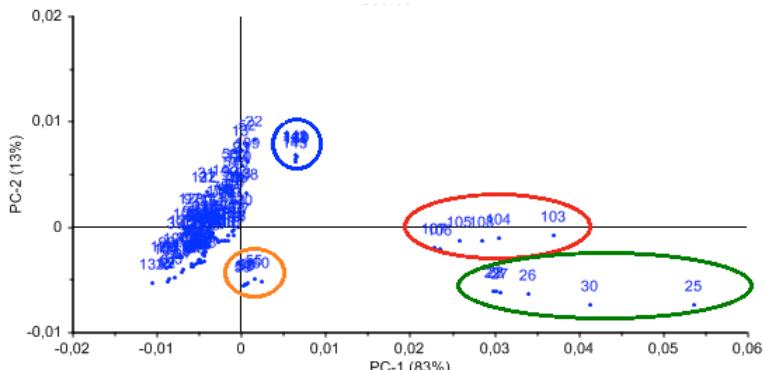


Figure 6: Organization of Raman spectra series along PCs; blue – untreated PS, red – AgNPs reduced by AA, green – AuNPs reduced by AA, orange – AgNPs reduced by D-Glu

4 Conclusion

The subject of this study was the vibrational spectroscopic examination of the interactions of the model samples of PS with BO and its analogues with vitamins, which were modified by different types and quantities of AgNPs or AuNPs. The study was focused mainly on the examination of the series of time-dependent spectra, revealing the enhancement of the substance penetration from BO into the PS by IR and Raman kinetic spectroscopic measurements.

The IR spectral data show, that the bands in the spectra of PS treated by BO without NPs exhibit no band shifts relative to the spectra of the untreated PS. Due to the addition of NPs shifts of some characteristic bands, predominantly amides I and II and deformation vibration bands of saturated aliphatic skeletons, were apparent. These shifts are caused by the interactions of modified BO with keratin and lipid components of the skin.

Application of NPs in different weight proportions stimulates intensity changes in the all spectral series. The maximal penetration effects were obtained by weight ratio 1:1, the penetration acceleration effect was progressively minimized by reduction of the amount of NPs in BO. This conclusion was confirmed further by the results of the multivariate statistical analysis from which revealed that NPs in the weight ratios 1:1 and 3:1 are significantly distinguishable from the other series of the spectra. The penetration enhancement was also examined in the presence of vitamins B6 and B1 additions to the BO. The selected NPs had influence to the accelerated penetration of the vitamins to the PS

The study showed that the effects of quantities and types of NPs on skin penetration characteristics are evident and the penetration mechanism will be further studied by near field IR microspectroscopy and confocal Raman microspectroscopy.

5 References

1. PROKSCH, E. The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology*, 2008, vol. 17, no. 12, s. 1063–1072.
2. GARIDEL, P. The microstructure of stratum corneum lipid barrier: mid-infrared spectroscopic studies of hydrated ceramides: palmitic acid: cholesterol model systems. *Biophysical chemistry*, 2010, vol. 150, no. 1–3, s. 144–156.
3. SIMOES, M. C. F. Skin cancer a new treatment perspectives: A review. *Cancer letters*, 2015, vol. 357, no. 1, s. 8–42.
4. http://www.bohs.org/uploadedFiles/Events/Past_Events/6b%20-%20P%20Pudney.pdf, downloaded on 14. 5. 2013
5. SULLIVAN, T. P. The pig as a model for human wound healing. *Wound repair and regeneration*, 2001, vol. 9, no. 2, s. 66–76.
6. SCHMOOK, F. P. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *International journal of pharmaceutical*, 2001, vol. 215, no. 1–2, s. 51–56.
7. OVAERE, P. The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends in biochemical sciences*, 2009, vol. 34, no. 9, s. 453–463,
8. HAFTEK, M. Compartmentalization of the human stratum corneum by persistent tight junction-like structures. *Experimental dermatology*, 2011, vol. 20, no. 8, s. 617–621.
9. RAITH, K. Progress in the analysis of stratum corneum ceramides. *European journal lipid science and technology*, 2004, vol. 106, no. 8, s. 561–671.
10. GEORGE, R. In vivo analysis of dermal and systemic absorption of silver nanoparticles through healthy human skin. *Australasian journal of dermatology*, 2014, vol. 55, no. 3, s. 185–190.
11. GENEVIÉVE, B. Physical characterization of stratum corneum of an in vitro psoriatic skin model by ATR-FTIR and Raman spectroscopies. *Biochimica et Biophysica acta*, 2007, vol. 1770, no. 9, s. 1317–1323.
12. WOHLRAB, J. Noninvasive characterization of human stratum corneum of undiseased skin of patients with atopic dermatitis and psoriasis as studied by Fourier transform Raman spectroscopy. *Biopolymers*, 2001, vol. 62, no. 3, s. 141–146.
13. O'REGAN, M. G., Raman profiles of the stratum corneum define 3 filaggrin genotype-determined atopic dermatitis endophenotypes. *Journal of allergy and clinical immunology*, 2010, vol. 126, no. 3, s. 574–580.
14. TAKADA, S. Noninvasive in vivo measurement of natural moisturizing factor content in stratum corneum of human skin by attenuated total reflection infrared spectroscopy. *Applied spectroscopy*, 2012, vol. 6, no. 1, s. 26–32.
15. GNIADECKA, M. Distinctive Molecular Abnormalities in Benign and Malignant Skin Lesions: Studies by Raman Spectroscopy. *Photochemistry and photobiology*, 1997, vol. 66, no. 4, s. 418–423.
16. MOSTACO-GUIDOLIN, L. B. Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Skin Cancer Cells and Tissues. *Applied spectroscopy reviews*, 2013, vol. 44, no. 5, s. 438–455.
17. WILLIAMS, A. C. Penetration enhancers. *Advanced drug delivery reviews*, 2012, vol. 64, no. 5, s. 128–137.

18. SCHWARZ, J. C. Comparison of ATR-FTIR spectra of porcine vaginal and buccal mucosa with ear skin and penetration analysis of drug and vehicle components into pig ear. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, vol. 50, no. 5, s. 595–600.
19. ZHAO, J. Real-time Raman spectroscopy for noninvasive in vivo skin analysis and diagnosis. *New developments in biomedical engineering*, Campolo, 2010, chapter 24, ISBN: 978-953-7619-57-2.
20. HARVEY, L. Real-time Raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis. *Cancer research*, 2012, vol. 72, no. 10, s. 2491–2500.
21. FUN-JUNG, S. Determination of Water Content in Skin by using a FT Near Infrared Spectrometer. *Archives of pharmacal research*, 2005, vol. 28, no. 4, s. 458–462.
22. NAKAGAWA, N. In vivo measurement of the water content in the dermis by confocal Raman spectroscopy. *Skin research and technology*, 2010, vol. 16, no. 2, s. 137–141.
23. RAITH, K. Progress in the analysis of Stratum corneum ceramides. *European journal of lipid science and technology*, 2004, vol. 106, no. 8, s. 561–571.
24. LABOUTA, H. I. Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: current status and critical review. *Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine*, 2013, vol. 9, no. 1, s. 39–54.
25. GEORGE, R. In vivo analysis of dermal and systematic absorption of silver nanoparticles through healthy human skin. *Australasian journal of dermatology*, 2014, vol. 55, no. 3, s. 185–190.
26. FILON, F. L. Nanoparticles skin absorption: New aspect for a safety profile evaluation. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 2015, vol. 72, no. 2, s. 310–322.
27. KHURANA, S. Preparation and evaluation of solid lipid nanoparticles based nanogel for dermal delivery of meloxicam. *Chemistry of physics and lipids*, 2013, vol. 175–176, no. 0, s. 65–72.
28. LARESE, F. F. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology*, 2009, vol. 255, no. 1–2, s. 33–37.
29. SONAVANE, G. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: effect of particle size. *Colloids and surface. B, biointerfaces*, 2008, vol. 65, no. 1, s. 1–10.
30. MAHAN, L. K. Krause's food, nutrition and diet therapy (10th ed.), Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000, ISBN: 0-7216-7904-8.
31. JOHANNSSON, S. Metabolic interconversion of different forms of vitamin B6. *Journal of biological chemistry*, 1973, vol. 249, no. 19, s. 6040–6046.
32. MUNIZ-MIRANDA, M. Stable and efficient silver substrates for SERS spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, vol. 314, no. 2, s. 540–544.
33. JURASEKOVA, Z. Raman and surface-enhanced Raman scattering (SERS) investigation of the quercetin interaction with metals: Evidence of structural changing processes in aqueous solution and on metal nanoparticles. *Journal of molecular structure*, 2009, vol. 918, no. 1–3, s. 129–137.
34. GRABAR, K. C. Preparation and characterization of Au colloid monolayers. *Analytical chemistry*, 1995, vol. 67, no. 4, s. 735–743.
35. VIGNESHWARAN, N. A novel one-pot “green” synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. *Carbohydrate research*, 2006, vol. 341, no. 12, s. 2012–2018.

36. DARROUDI, M. Green synthesis and characterization of gelatin-based and sugar-reduced silver nanoparticles. *International journal of nanomedicine*. 2011, vol. 6, s. 569–574.
37. RAVEENDRAN, P. A simple and “green” method for the synthesis of Au, Ag, and Au–Ag alloy nanoparticles. *Green chemistry*, 2006, vol. 8, no. 1, s. 34–38.
38. QIN, Y. Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering aspects*, 2010, vol. 372, no. 1–3, s. 172–176.

The study of two-photon properties of derivatives diketo-pyrrolo-pyrrole

Jan Koutný

Silvie Hrbková, Martin Vala, Martin Weiter

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Materials Research Center

Purkyňova 464/118, Brno, CZ-61200, Czech Republic

xckoutny2@fch.vutbr.cz

Two-photon absorption (2PA) is nonlinear optical phenomenon. The main difference between one-photon absorption (1PA) and 2PA is that 2PA involves simultaneous absorption of two photons of half of the energy (or twice the wavelength) of one molecule. Because of this difference 2PA has many advantages in comparison with traditional 1PA and we can use it in many applications, for instance three dimensional fluorescence microscopy, lithographic nanofabrication, three dimensional data storage, optical power limiting, photodynamic therapy, and for the localized release of bio-active species.

These applications require new dyes with high two-photon absorption cross-section. Two-photon absorption cross-section describes efficiency of 2PA process in molecule with the given wavelength. If we want to produce this dye, we have to understand the relationship between the chemical structure and 2PA properties.

The aim of this contribution is the study of 2PA properties derivatives diketo-pyrrolo-pyrrole, particularly two-photon absorption cross-section. We use Nd:YAG laser with TWHM 30 ps as the excitation source. Rhodamine B and Rhodamine 6G were used as standards for measuring of two-photon excited fluorescence.

Keywords: two-photon absorption, nonlinear optical phenomenon, two-photon excited fluorescence, two-photon absorption cross-section.

The author didn't submit the contribution before the proceedings deadline.

Rheology of Superabsorbent Polymers

Romana Kratochvílová

Martina Klučáková, Petr Sedláček, Jiří Smilek, Milan Kráčalík

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Materials Research Centre

Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic

xckolajova@fch.vutbr.cz

1 Introduction

Many researchers are trying to solve the problem with continuous increasing degradation of agricultural lands. The ground is still more and more devastated mainly because of its wasteful cultivation and excessive fertilization. These facts have big impact on the loss of soil organic matter. The solution of these problems can be found in application of humic substances which constitute the most ubiquitous source of soil organic matter in nature¹. They have important role in soil fertility such as stimulating plant growth, enhancing the resistance of crops, improving soil structure and increasing soil retention of water and fertilizer².

The most important fraction of humic substances are humic acids³. There is a very complex way of their dissolution in the water solution which affects their transport from soil into the herbal body⁴. Research of humic acid's transportation is very important mainly because of our understanding of their function in nature⁴⁻⁷. They are able to diffuse themselves through various environment moreover they can work as a transport vehicle for other compounds⁷. The application of humic acids into the environment is very important especially for their ability to form water-soluble complex in reaction with metals⁸⁻¹¹.

Superabsorbent polymers are loosely crosslinked, three dimensional networks of flexible polymer chains that carry dissociated, ionic groups which cause their ability to absorb large quantities of water and other aqueous solutions without dissolving by solvation of water molecules via hydrogel bonds.

Superabsorbent polymers have a wide range of usage. In the field of agriculture and environmental protection they are very often used as a water hanger during a dry season nowadays. In contrary they avoid to decay of plants' root system in the time of heavy rains. There is a new trend in a field of superabsorbent polymers and it is an incorporation of fertilizers into the gel structure. This can be considered as a functional system which allows controlled release of substances that support growing and maturing of plants. Such mechanism solves the problem with flushing of fertilizers into deep underground water and avoids to overfertilize of ground as well^{12, 13}.

In this work, novel superabsorbent material for agricultural and environmental application was reported. The properties of specific superabsorbent polymers are extremely important for selecting a material for a given application. Here will be

discussed method of characterizing superabsorbent polymers using rheological techniques to probe their mechanical response. Further, there will be comparison of their swelling behaviour.

2 Experimental

2.1 Materials

Six different samples of superabsorbent polymers based on acrylic acid were used in this work. All of them have a certain addition of NPK fertilizer. Some of them have also an addition of humic substance in a form of commercial lignohumate. Furthermore the samples also differ in a content of acrylamide in the structure. There was big effort to avoid presence of acrylamide in the structure of superabsorbent because of its toxicity. Accurate representation of these selected substances can be found in Table 1.

Table 1: Table title

sample	A	B	C	D	E	F
NPK [%]	1	10	1	10	1	10
lignohumate	no	no	yes	yes	Yes	yes
acrylamide	yes	yes	no	no	Yes	yes

These samples were prepared in cooperation with Amagro, s.r.o. company and their composition will not be specified in more details because of the intellectual property protection.

2.2 Swelling measurements

Monitoring of swelling behavior was carried out by very simple method, sometimes referred to as "tea bag" method. 0.5 g of each sample was immersed in excess distilled water of volume 200 mL at room temperature for 24 hours to reach the swelling equilibrium. Swollen samples were then separated from unabsorbed water. Water absorbency in distilled water of the superabsorbent composite Q , was calculated using the following equation:

$$Q = \frac{m - m_0}{m_0}, [g / g] \quad (1)$$

where m_0 and m are the weights of the dry sample and swollen sample, respectively. Q is calculated as grams of water per gram of dry sample. On the Figure 1 a) is displayed xerogel of superabsorbent polymer before immersion to the excess of distilled water. On the b) there is a swollen gel after 24 hours in the water.



Figure 1: a) Xerogel of superabsorbent polymer; b) Swollen superabsorbent polymer

2.3 Viscoelastic measurements

The viscoelastic experiments of the fully swollen superabsorbent polymer particles were carried out in Anton Paar Physica MCR 501 rheometer (see Figure 2) partially according to a previously reported method¹⁴. The measurement was done at 30 ± 2 °C using a parallel plate system (PP25-SN6375, 1 mm diameter) at 1 mm gap. Viscoelastic measurements, oscillation – frequency sweep and strain sweep, were performed for each sample and the obtained values of moduli G' and G'' were compared. Storage modulus G' is proportional to the extent of the elastic component and loss modulus G'' is rational to the extent of the viscous component of the system. The strength of materials is measured by the magnitude of $\tan \delta$ (the ratio G''/G'), where δ is a phase angle.



Figure 2: Anton Paar Physica MCR 501

3. Result and discussion

Swelling behaviour of all superabsorbent samples were determined by the measurement of water absorbency. The results show that all samples exhibit very good swelling properties, as it is displayed on Figure 3. The results revealed some interesting findings. The samples differed from each other by special composition that is shown in Table 1. There is a significant negative effect on superabsorbent swelling properties caused by the higher content of NPK in the structure of sample. These samples B, D and F reflect much lower ability to absorb surrounding water and they were not followed to the further testing. Samples with an addition of lignohumate swelled significantly better than samples without lignohumate. That is caused by hydrophilic character of lignohumate.

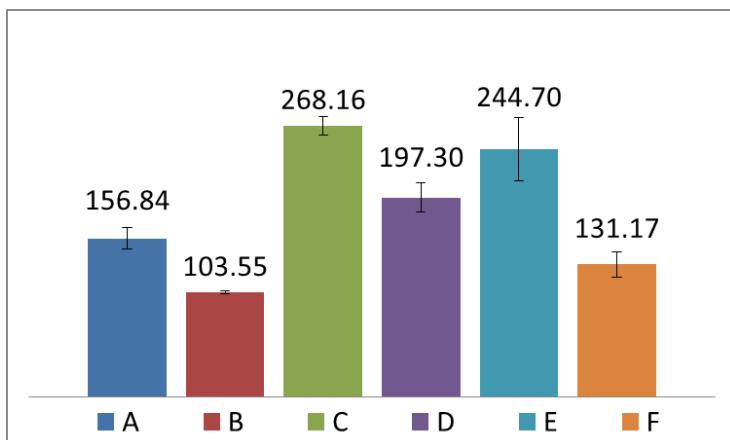


Figure 3: Water absorbency Q of SAP samples

Viscoelastic studies of these swollen superabsorbent samples were determined by means of the rheological method. Determination of the linear viscoelastic region was performed by strain sweep experiments. Loss modulus and storage modulus are independent of the stress amplitude as it is displayed on Figure 4. The storage modulus was always larger than the loss modulus at the linear viscoelastic region.

Values of $\tan \delta$ are plotted in Figure 5. As is mentioned before, $\tan \delta$ is the ratio of G''/G' , where δ is a phase angle. If the value of $\tan \delta$ is larger than 1, it means G'' is higher than G' , the system behaves like a liquid. In contrary, if the value of $\tan \delta$ is smaller than 1, it means G'' is smaller than G' , the superabsorbent exhibits solid-like behaviour. Accordingly, the strength of the interaction or network structure is basically measured by the magnitude of $\tan \delta$. The smaller the $\tan \delta$ is, the stronger the interaction becomes. There are results which show that the strength of the superabsorbents inversely correlates with their water absorbency.

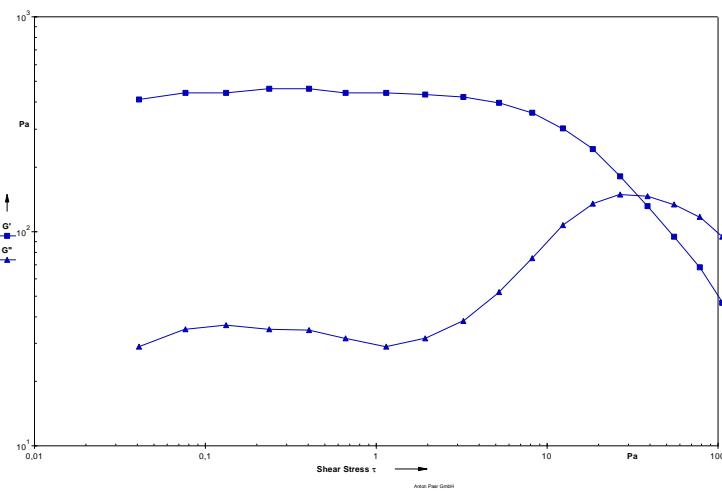


Figure 4: Example of measured viscoelastic properties of the superabsorbent

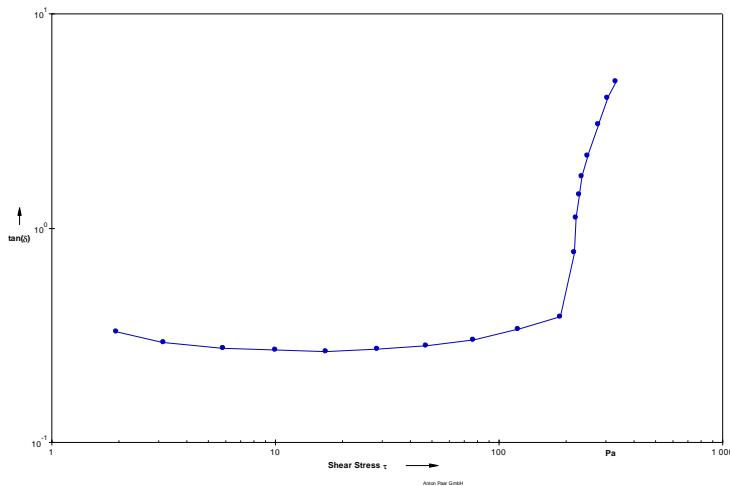


Figure 5: Example of measured viscoelastic properties of the superabsorbent.

4 Conclusion

Novel superabsorbent composites for agricultural and environmental usage were developed and investigated. There were several samples with various composition compared. The result of our experiments showed that we are able to prepare superabsorbent polymers of various swelling behaviour. Storage modulus obtained from viscoelastic measurements indicated that an increase in swelling capacity led to a decrease

in gel strength. Used samples of superabsorbent polymers behave as viscoelastic solids. Because the polymer network is crosslinked, the gel network consists of one very large branched polymer which spans the entire gel. These samples exhibit huge potential to become one of the modern forms of fertilizer which can provide matrix for sustainable controlled release system.

5 References

1. PICCOLO, A. a H.S.C. MBAGWU. Exogenous humic substances as conditioners for the rehabilitation of degraded soils. *Agro Food Ind. Hi Tech.* 1997, (8): 2–4.
2. LAL, R. Soil Carbon Sequestration Impacts on Global Climate Change and Food Security. *Science.* 2004, 304(5677): 1623-1627. DOI: 10.1126/science.1097396. ISSN 0036-8075.
3. STEVENSON, F. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions.* 2nd Ed. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1994, 496 s. ISBN 04-715-9474-1.
4. KLUČÁKOVÁ, M.; KOLAJOVÁ, R. Dissociation Ability of Humic Acids: Spectroscopic Determination of pKa and Comparison with Multi-step Mechanism. *Reactive and Functional Polymers* 2014. Vol. 78, No. 1, p. 1–6.
5. ATALAY, Yasemin B., Richard F. CARBONARO a Dominic M. DI TORO. Distribution of Proton Dissociation Constants for Model Humic and Fulvic Acid Molecules. *Environmental Science.* 2009, 43(10): 3626–3631.
6. Comparison Between the Effect of Ionic Strength on Acidity and Dissociation Constants of Humic Acids Extracted from Sewage Sludge and Nile Water Hyacinth Composts. *Global Journal of Environmental Research* 6. 1. 2009, (43): 36–43.
7. KLUČÁKOVÁ, M.; PEKAŘ, M. Transport of Copper(II) Ions in Humic Gel – New Results from Diffusion Couple. *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2009. Vol. 349, No. 1-3 , p. 96–101.
8. LUBAL, P., D. ŠIROKÝ, D. FETSCH a J. HAVEL. The acidobasic and complexation properties of humic acids Study of complexation of Czech humic acids with metal ions. *Talanta.* 1988, 47(2): 401–412.
9. LUBAL, P., D. FETSCH, D. ŠIROKÝ, M. LUBALOVÁ, J. ŠENKÝR a J. HAVEL. Potentiometric and spectroscopic study of uranyl complexation with humic acids. *Talanta.* 2000, 51(5): 977–991.
10. PACHECO, M.L. a J. HAVEL. Capillary zone electrophoretic (CZE) study of uranium(VI) complexation with humic acids. In: *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* [online]. 2001, 248(3), s. 565–570.
11. GHABBOUR, Elham A. *Humic Substances: Versatile Components of Plants, Soil and Water.* Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000, 341s. ISBN 08-540-4855-3.
12. DAVIDSON, Drew, Frank X. GU a Richard M. WILKINS. Materials for Sustained and Controlled Release of Nutrients and Molecules To Support Plant Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2012, 60(4): 343–356.
13. LIU, Guodong, Lincoln ZOTARELLI, Yuncong LI, David DINKINS, Qingren WANG a Monica OZORES-HAMPTON. Controlled-Release and Slow-Release Fertilizers as

- Nutrient Management Tools. EDIS - Electronic Data Information Source - UF/IFAS Extension [online]. University of Florida, 2014.
14. POURJAVADI, Ali a Hossein HOSSEINZADEH. Synthesis and Properties of Partially Hydrolyzed Acrylonitrile-co-Acrylamide Superabsorbent Hydrogel. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2010-11-20, vol. 31, issue 11, s. 3163–3172.

The authors acknowledge the financial supports provided by project AKTION Czech Republic – Austria No. 73p17 Characterisation of complex systems for biological applications using advanced rheological spectroscopical techniques.

Measurement of Heat Capacity Using Method of Thermal Relaxation Calorimetry

*Tomáš Mahnel
Květoslav Růžička*

*University of Chemistry and Technology Prague, Faculty of Chemical Engineering,
Department of Physical Chemistry
Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice, Czech Republic
tomas.mahnel@vscht.cz*

1 Introduction

Heat capacity belongs among important physicochemical quantities which characterize a compound. It is directly linked with temperature derivatives of basic thermodynamic functions and therefore indispensable for the calculation of differences in these functions between different temperatures. This information is then used in chemical engineering for establishing energy balances or in thermodynamics for computing entropy and enthalpy values.¹ The difference between heat capacity of gas phase and condensed phase is directly linked by exact thermodynamic relationships with vapor pressure and therefore can be used for simultaneous correlation of these two quantities.²⁻⁴

Heat capacity C is defined by the differential equation

$$C_x = \left(\frac{\partial Q}{\partial T} \right)_x , \quad (1)$$

where Q means the amount of heat exchanged between the system and the surroundings when the temperature T changes under conditions specified by x . Heat capacity can be measured under constant volume, than $x = V$ and it is called isochoric heat capacity, or under constant pressure, than $x = p$ and it is called isobaric heat capacity.

Method used for determining heat capacities is calorimetry. There are many calorimetric techniques and types of heat capacity calorimeters. As the most precise technique is considered the adiabatic calorimetry which can produce high quality data over wide range of temperatures with relative error between 0.05 % and 0.1 %.¹ Main disadvantage of this method is the non-availability of commercial instruments (their construction is both complicated and time-consuming).

Widely used technique is differential scanning technique (or differential scanning calorimetry, DSC) with twin vessel arrangement where the temperature of measuring and reference cells is increased simultaneously over a wide temperature range and the effect corresponding to the difference in the thermal response of the two cells is measured

directly. There are commercially available instruments and one can work with small amount of sample.⁵

1.1 Thermal Relaxation Calorimetry

Thermal relaxation calorimetry is a technique of heat capacity measurement developed in 1970's.⁶ Today, there are commercially available instruments which enable measurement of heat capacity in wide range of temperatures. Mass of sample required is in order of milligrams. The basic concept of thermal relaxation calorimetry is shown in Figure 1.

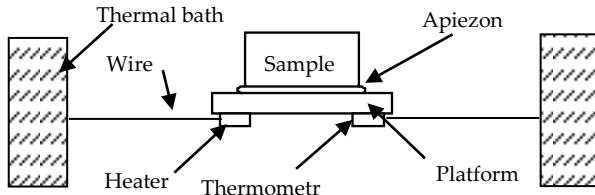


Figure 1: Basic concept of thermal relaxation calorimetry

The sample is attached to the platform and the platform is linked through thin wires to the heat sink which is held at constant temperature. On the bottom side of platform, there is the heater and the thermometer. Constant power, P , is applied to the platform for a period of time, during which the temperature rises. Then the heater is turned off and the temperature drops. This process is shown in Figure 2.

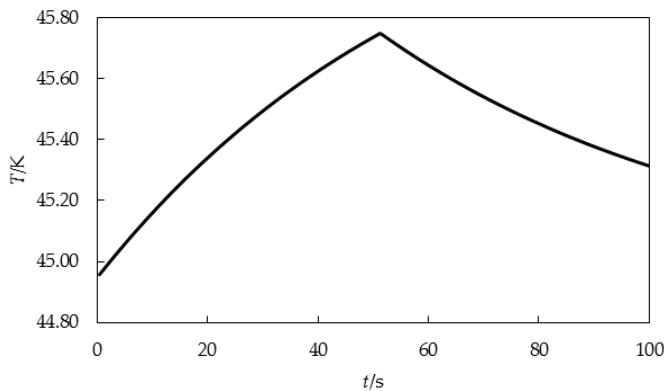


Figure 2: Time dependence of temperature of sample

The time dependence of temperature of sample can be described by using two models. In simpler one, there is assumed perfect thermal contact between the sample and

the platform. Then the differential equation representing heat balance equation can be written:

$$P(t) = C_{\text{total}} \frac{dT(t)}{dt} + K_w(T(t) - T_b), \quad (2)$$

where P is power, t time, C_{total} heat capacity of sample and platform, T temperature of sample and platform, K_w heat conductivity of wires which connect platform with heat sink and T_b temperature of heat sink. In time interval from 0 to t_0 , constant power P_0 is applied and then the heater is turned off (i. e. $P = 0$). Solution of equation (2) with boundary conditions $T(0) = T_b$ and $T_{\text{off}}(t_0) = T_{\text{on}}(t_0)$ is as following:

$$T(t) = \begin{cases} T_{\text{on}}(t) = P_0 \tau (1 - e^{-t/\tau}) / C_{\text{total}} + T_b & (0 \leq t \leq t_0) \\ T_{\text{off}}(t) = P_0 \tau (1 - e^{-t_0/\tau}) e^{-(t-t_0)/\tau} / C_{\text{total}} + T_b & (t > t_0) \end{cases}, \quad (3)$$

where T_{on} , resp. T_{off} describes time dependence of temperature in time range when heater is turned on, resp. off. The quantity denoted as τ is relaxation time and is defined as

$$\tau = \frac{C_{\text{total}}}{K_w} \quad (4)$$

K_w , T_b and C_{total} are unknowns obtained by minimizing objective function

$$S(C_{\text{total}}, K_w, T_b) = \sum_i (T(t_i) - T_i)^2 \quad (5)$$

where $T(t)$ is temperature recorded during measurement and T_i result of equation (3).

Assumption of perfect thermal contact between sample and platform is not usually fulfilled. Therefore it is better to use more complicated model which assumes imperfect thermal contact between sample and platform and which consists of set of two differential (heat balance) equations:

$$\begin{aligned} P(t) &= C_{\text{add}} \frac{dT_{\text{add}}(t)}{dt} + K_w (T_{\text{add}}(t) - T_b) + K_g (T_s(t) - T_{\text{add}}(t)) \\ C_s \frac{dT_s(t)}{dt} &= K_g (T_{\text{add}}(t) - T_s(t)) \end{aligned}, \quad (6)$$

where quantities used have the same meaning as in equation (2) and moreover C_{add} is heat capacity of addenda (for explanation of this term see section 2.2), T_{add} temperature of addenda (which is slightly different from temperature of sample), K_g heat conductivity of grease which is used to attach the sample to the platform, T_s temperature of the sample and C_s heat capacity of the sample. The analytical solution of set of equations (3) can be expressed in the form of sum of two exponentials:

$$T(t) = T_b + Ae^{-t/\tau_1} + Be^{-t/\tau_2} \quad (7)$$

where A , B , τ_1 and τ_2 are expressions containing C_{add} , C_s , K_g , K_w and T_b . Time constant τ_1 is much longer than time constant τ_2 . Solution of set of equations (3) proposed Hwang⁷ and it is adopted in fitting algorithm used in PPMS software for evaluating heat capacity of sample.

2 Experimental

On the market, there are available commercial apparatus for heat capacity measurements using method of thermal relaxation calorimetry. One of them is produced by Quantum Design (USA, San Diego) and is called PPMS (Physical Property Measurement System). This system can be used for measurement of magnetic and electric properties of materials too. Heat capacity option was introduced in 1998 on the market and since then it became very popular among scientists. More than 300 scientific articles with data measured using PPMS heat capacity option were published but just a few workers reported details about their measurements and examined performance of their apparatus.

2.1 Materials

For performance of PPMS heat capacity option testing, synthetic sapphire and copper were used. Both materials are calorimetric standards and high quality heat capacity data from adiabatic calorimeters are available for them.⁸ Sample of sapphire (standard compound for Netzsch calorimeters) used had mass of 13.76 mg and square shape (3×3) mm². Three samples of copper with different masses were prepared by cutting from OFHC (Oxygen Free High Conductivity) copper sealing supplied by Pfeiffer Vacuum. Masses of these three samples were 31.67 mg, 64.26 mg and 127.46 mg. All of them were washed in solutions of hydrochloric acid and nitric acid after cutting according to NIST recommendation.⁹

For testing of abilities of the PPMS to measure powdered or volatile samples, anthracene (supplied by Sigma-Aldrich) in form of pellet of mass 38.23 mg was used. This pellet was closed in an aluminum DSC pan with mass of 52.45 mg (supplier: TA Instruments).

Apiezon N grease (ANG) was used to attach sample on the measuring platform. The grease serves not only as mechanical support (the sample doesn't fall down from the platform) but as a thermal connection between sample and platform too. Amount of ANG typically used was approximately 0.5 mg.

2.2 Measurement procedure

Measurement of heat capacity of sample consists from two steps - addenda measurement and sample measurement. Addenda measurement means heat capacity measurement of empty platform (which has square shape with dimensions (3×3) mm² and which is made from sapphire in case of PPMS) with small amount of Apiezon N

grease. Sample measurement is then heat capacity measurement of system consisting from sample and platform with small amount of Apiezon N grease. Heat capacity of sample is finally evaluated in software MultiVu which is delivered as a part of PPMS. Principles of this procedure were briefly described in section 1.1.

Heat capacity measurement of sample closed in DSC pan has to be done in three or four step procedure. Three steps are needed in case that the DSC pan doesn't have to be removed from the platform to insert sample inside. This is the case of present work. First step is addenda measurement, second step is measurement of heat capacity of empty DSC pan and third step is measurement of heat capacity of DSC pan with sample inside. Heat capacity of sample is than computed as difference between C_p of DSC pan with sample inside and C_p of empty DSC pan. This procedure has to be done manually outside MultiVu software because this type of measurement was not expected by designing PPMS heat capacity option.

Temperature range used for measurements was (2 - 300) K. In this range, individual temperature points were chosen. Distances between each two points were between 5 K and 10 K by temperatures higher than 30 K, 2 K in temperature range 10 K to 30 K and less than 2 K by temperatures lower than 10 K. At each temperature, heat capacity measurement was repeated three times.

3 Results and Discussion

3.1 Testing of apparatus – heat capacity of copper and sapphire

Obtained values of heat capacities of sapphire and copper were compared to literature values. For this purpose, high quality data from adiabatic calorimeters by Dietmars et al.¹⁰ for sapphire and by White and Collocott¹¹ for copper were used. In these articles, there can be found analytical expressions for temperature dependence of heat capacity for both compounds. These expressions are valid in temperature range (8.61 - 2 250) K for sapphire and (0.3-1 300) K for copper.

Relative deviations of data measured using PPMS from data measured on adiabatic calorimeters for sapphire and copper are shown in figures 3 and 4.

In both figures, 3 and 4, is each experiment (denoted by letters A, B, C...) showed by different symbol and each run by different color of given symbol (run 1 – blue, run 2 – red, run 3 – black). It can be seen that first run usually differs significantly from second and third run. When only second run and third run are considered, the relative deviation from literature values for sapphire is less than 2 % above 100 K. Below 100 K, the relative deviation becomes larger, reaching nearly 25 % below 10 K. Explanation of possible reasons of such large deviation proposes Lashley¹²: (1) there is no electron specific-heat contribution to the total specific heat; (2) sapphire has a high Debye temperature and the phonon contribution to the total specific heat is small below 60 K; (3) the low density of sapphire limits the number of atoms that can be placed on the 9 mm² sample platform, and the sample-to-addenda heat capacity ratio drops steadily with decreasing temperature; and (4) there are large error bars on the reference data set on the NIST sapphire below 60 K, and sample-to-sample variations, including differences in concentration of O vacancies are common.

The contribution of sample heat capacity to the total heat capacity should be examined too. Ratio of sample heat capacity to addenda heat capacity is showed in figure 3. The higher contribution of sample heat capacity to the total heat capacity, the better. This can be fulfilled when sample with bigger mass is used. But then, the sample has bigger volume and there can form temperature gradient through it (especially in case of insulators). Therefore it is hard to find an "ideal" sample from point of view of mass. Kennedy recommends to use more samples with different masses and to compare obtained results among themselves.¹³

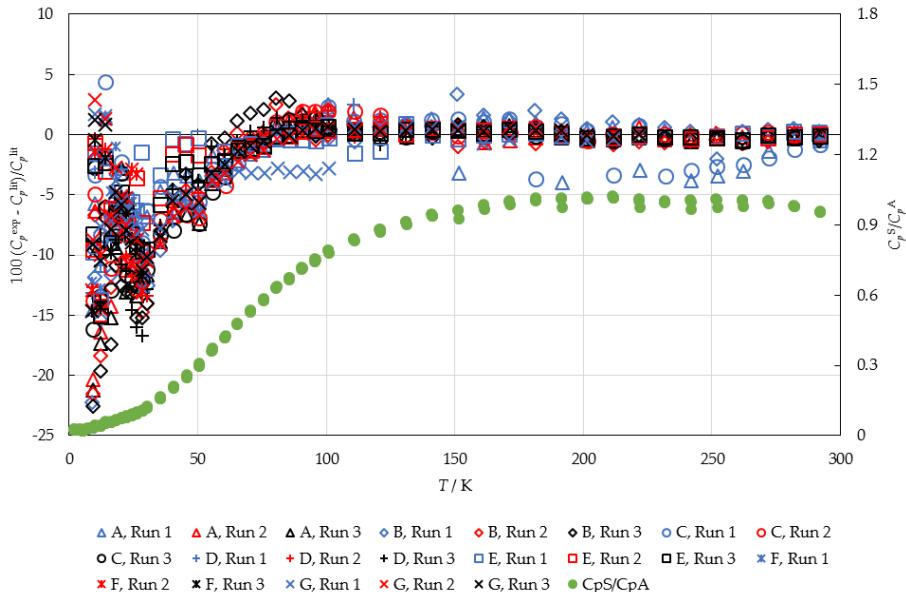


Figure 3: Relative deviation of heat capacity measured using PPMS (C_p^{exp}) from literature values (C_p^{lit}) for sapphire (13.76 mg) In legend, letters A, B, C... denote individual experiment

From figure 4 can be seen that the relative deviation from literature values for copper (when second run and third run are considered) is less than 1 % in temperature range 100 K – 300 K, below 100 K, the relative deviation rises to 3 %. When compared results for different masses of sample, it can be concluded that the relative deviation from literature values (and therefore the heat capacity measured using PPMS too) is independent on the mass used in case of copper. But this conclusion can't be generalized for all compounds.

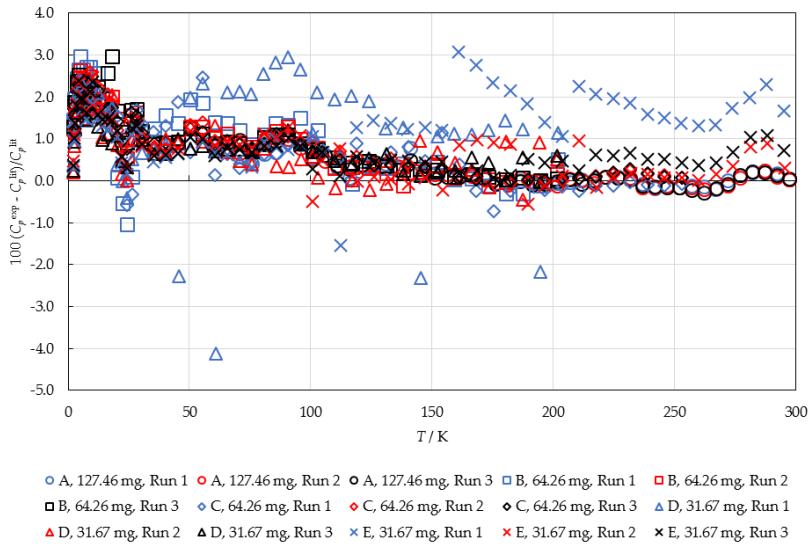


Figure 4: Relative deviation of heat capacity measured using PPMS (C_p^{exp}) from literature values (C_p^{lit}) for copper. In legend, letters A, B, C... denote individual experiments, given mass means mass of sample used

3.2 Measurement of heat capacity of anthracene sealed in DSC pan

Measurement of heat capacity of powdered or volatile samples sealed in DSC pans first proposed Marriott in his Ph.D. thesis^{14, 15} and latter Dachs and Bertholdi.¹⁶ In literature, there are reported another encapsulation techniques too.^{17–19}

Marriott¹⁵ used in his work aluminum DSC pans (Perkin-Elmer, Kit No. 0219-0062, mass of ca. 25 mg) with Apiezon N inside the pan. Tested compounds were benzoic acid and copper standards. The accuracy claimed is 2 % in temperature range 1 K – 300 K.

Dachs and Bertholdi¹⁶ used in their work non-specified aluminum DSC pans. Tested compounds were sapphire, fayalite and sanidine. Apiezon N was not applied inside the pan. Authors claim that highest accuracy was achieved when the samples (single crystals or sintered powder) were directly placed on the platform. When the heat capacity was measured on powders sealed in DSC pan, the accuracy didn't achieve such high level, but data were systematically lower by 1–2 % than published data.

In this work, anthracene in form of pellet was used and measurement was carried out without Apiezon N inside the pan. Anthracene was chosen because it is a member of compound group studied in our laboratory. Obtained results were compared with data from adiabatic calorimeter reported by Goursot et al.²⁰ In figure 5, there is shown ratio of heat capacity reported in literature to heat capacity measured on PPMS. The large discrepancy between literature values and results from PPMS can be caused by non-ideal thermal contact between DSC pan and pellet or temperature gradient through the pellet.

Next experiments are in plan to find out limitations of this technique and possibilities to improve it.

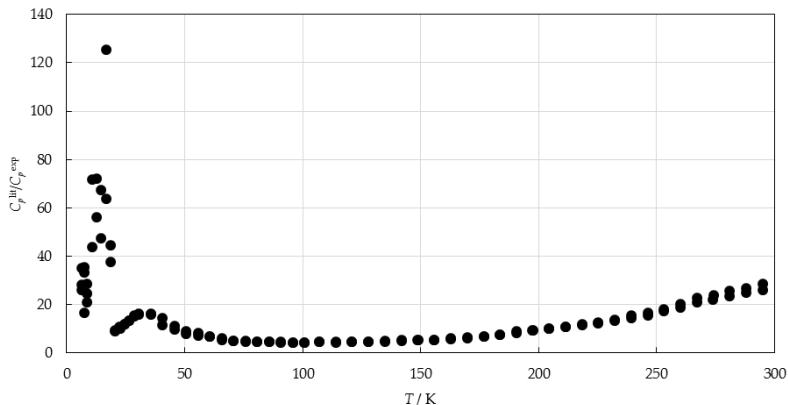


Figure 5: Ratio of literature values of heat capacity of anthracene (C_p^{lit}) to heat capacity of anthracene sealed in aluminum DSC pan measured on PPMS (C_p^{exp})

4 References

- ZÁBRANSKÝ, M., RŮŽIČKA, V., MAJER, V. AND DOMALSKI, E. S. *Heat Capacity of Liquids. Critical Review and Recommended Values.* Edition ed. Washington, D. C.: American Chemical Society, 1996. ISBN 1-56396-600-X.
- RŮŽIČKA, K., FULEM, M. AND RŮŽIČKA, V. Recommended Vapor Pressure of Solid Naphthalene. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 2005, 50 (6), 1956–1970.
- RŮŽIČKA, K. AND MAJER, V. Simultaneous Treatment of Vapor Pressures and Related Thermal Data between the Triple and Normal Boiling Temperatures for N-Alkanes C5-C20. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 1994, 23(1), 1–39.
- RŮŽIČKA, K. AND MAJER, V. Simple and Controlled Extrapolation of Vapor Pressures toward the Triple Point. *AICHe Journal*, 1996, 42(6), 1723–1740.
- HÖHNE, G., HEMMINGER, W. AND FLAMMERSHEIM, H. J. *Differential Scanning Calorimetry : An Introduction for Practitioners.* Edition ed. Berlin; New York: Springer-Verlag, 1996. ISBN 3540590129 9783540590125.
- BACHMANN, R., DISALVO, F. J., JR., GEBALLE, T. H., GREENE, R. L., et al. Heat Capacity Measurements on Small Samples at Low Temperatures. *Rev. Sci. Instrum.*, 1972, 43(2), 205–214.
- HWANG, J. S., LIN, K. J. AND TIEN, C. Measurement of Heat Capacity by Fitting the Whole Temperature Response of a Heat-Pulse Calorimeter. *Review of Scientific Instruments*, 1997, 68(1), 94–101.
- SABBAH, R., AN, X. W., CHICKOS, J. S., LEITAO, M. L. P., et al. Reference Materials for Calorimetry and Differential Thermal Analysis. *Thermochimica Acta*, 1999, 331(2), 93–204.
- REED, W. P. Report of Investigation, Reference Material 5, Copper Heat Capacity. 1992.

10. DITMARS, D. A., ISHIHARA, S., CHANG, S. S., BERNSTEIN, G., et al. Enthalpy and Heat-Capacity Standard Reference Material: Synthetic Sapphire (A-Al₂O₃) from 10 to 2250 K. *J. Res. Natl. Bur. Stand. (U.S.)*, 1982, 87(2), 159–163.
11. WHITE, G. K. AND COLLOCOTT, S. J. Heat Capacity of Reference Materials: Copper and Tungsten. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 1984, 13(4), 1251–1257.
12. LASHLEY, J. C., HUNDLEY, M. F., MIGLIORI, A., SARRAO, J. L., et al. Critical Examination of Heat Capacity Measurements Made on a Quantum Design Physical Property Measurement System. *Cryogenics*, 2003, 43(6), 369–378.
13. KENNEDY, C. A., STANCESCU, M., MARRIOTT, R. A. AND WHITE, M. A. Recommendations for Accurate Heat Capacity Measurements Using a Quantum Design Physical Property Measurement System. *Cryogenics*, 2007, 47(2), 107–112.
14. MARRIOTT, R. A. Thermodynamic Stability Studies of Racemic and Conglomerate Enantiomeric Crystals. Ph. D., 2004.
15. MARRIOTT, R. A., STANCESCU, M., KENNEDY, C. A. AND WHITE, M. A. Technique for Determination of Accurate Heat Capacities of Volatile, Powdered, or Air-Sensitive Samples Using Relaxation Calorimetry. *Rev. Sci. Instrum.*, 2006, 77(9), 096108/096101–096108/096103.
16. DACHS, E. AND BERTOLDI, C. Precision and Accuracy of the Heat-Pulse Calorimetric Technique: Low-Temperature Heat Capacities of Milligram-Sized Synthetic Mineral Samples. *Eur. J. Mineral.*, 2005, 17(2), 251–261.
17. JAVORSKÝ, P., WASTIN, F., COLINEAU, E., REBIZANT, J., et al. Low-Temperature Heat Capacity Measurements on Encapsulated Transuranium Samples. *Journal of Nuclear Materials*, 2005, 344(1–3), 50–55.
18. SHI, Q., BOERIO-GOATES, J. AND WOODFIELD, B. F. An Improved Technique for Accurate Heat Capacity Measurements on Powdered Samples Using a Commercial Relaxation Calorimeter. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 2011, 43(8), 1263–1269.
19. SHI, Q., SNOW, C. L., BOERIO-GOATES, J. AND WOODFIELD, B. F. Accurate Heat Capacity Measurements on Powdered Samples Using a Quantum Design Physical Property Measurement System. *J. Chem. Thermodyn.*, 2010, 42(9), 1107–1115.
20. GOURSOT, P., GIRDHAR, H. L. AND WESTRUM, E. F. Thermodynamics of Polynuclear Aromatic Molecules: 3. Heat Capacities and Enthalpies of Fusion of Anthracene. *Journal of Physical Chemistry*, 1970, 74(12), 2538–2541.

Acknowledgement

The author would like to acknowledge the financial support from specific university research (MSMT No 20/2015)

Overview of Hydrogen Economy

*Ing. et Bc. Jiří Marek
doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.*

*Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Chemistry and Technology of Environmental protection
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno
xcmarekj@fch.vutbr.cz*

1 Introduction

Hydrogen economy represents a possible new direction for energy applications. Probably the best-known part of this concept is the use of hydrogen in the automotive industry as a future replacement of fossil fuels, however the potential of its applications is much wider. Although the real deployment of hydrogen technologies is a long-term issue, we can find a range of demonstration applications that support the development of the concept already¹.

Hydrogen as a new energy carrier of the future is a very topical area of research. The basic areas of interest can be divided in 4 main fields of research: hydrogen production (from fossil and renewable sources), hydrogen storage (physical/chemical ways), hydrogen use (fuel cells and combustion engines) and hydrogen infrastructure (on site/off site production, pipeline systems etc.).

The contribution will present a contemporary overview of state of the art of hydrogen technologies in the context of European Union based on author's experience gained during his bachelor (topic of thesis: hydrogen storage possibilities for mobility transport) and master studies (topic of thesis: hydrogen production by photocatalytic water splitting).

The final part of the presentation will focus on the author's topical field of the study that is the concept of a wastewater plant (WWTP) as a "biorefinery", which is also the topic of author's Ph.D. studies. The main area of discussion is going to be devoted to the topic of WWTP as a possible future renewable energy source through the production of biogas and biohydrogen.

Motto:

"It is not really a question of whether we can afford the hydrogen infrastructure. The question is whether we can afford not to have hydrogen infrastructure if we want to use renewables"

Charlie Frees, Executive Director of Global Fuel Cell Activities, General Motors²

2 Overview of Hydrogen Technologies

The cities and the livability of cities are changing and evolving very rapidly. Until 2050, the majority of people of the planet should be living in cities and cities should become more friendly organic structures for everyday life³.

New development of cities is closely related to air pollution problem from transport and industry. This represents a very important and already topical problem for megapolis such as London or Tokyo. It is thus probable, that the fulfilment of the ecological limits in big cities in near future is not going to be viable⁴.

Transport as practically the biggest air polluter of the city environment is then the first place of interest of majority of political initiatives towards the improvement of living standards. From the point of view of the hydrogen technologies as a potential clean energy source, this attention enables the realization of demonstrative projects that are very important for the development of whole concept of hydrogen economy, because the demonstration projects are important to bring necessary political and also public attention towards hydrogen technologies. The improvement of public awareness about hydrogen technologies in the area of safety measures historically connected to hydrogen is also very important^{1, 5, 6, 7}.

The use of hydrogen in real-world applications in automotive transport is already the reality in public transport⁸. The broadening of hydrogen use towards personal mobility vehicles can be expected in very near future (in 2015 was released into the serial production the second car in the world based on hydrogen fuel – Toyota Mirai)⁹. There are two main factors that impede the overall development and incorporation of hydrogen technologies. The first one is the price of such products and the second one is the lack of necessary infrastructure. The price is expected to decrease together with increasing demand for these technologies and overall decrease of manufacturing cost of these products in future. The topic of infrastructure is more complicated and there are several issues that have to be resolved yet. Nevertheless there is already an existing strong potential to build the necessary infrastructure today. Author can't forget to mention in the context of Europe the German initiate to build 400 hydrogen fuelling stations until 2023¹⁰. The overview of so called „Hydrogen Challenge“ can be schematically viewed on Figure 1.

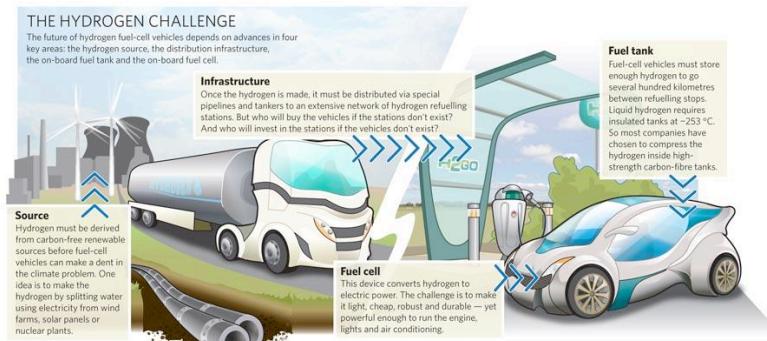


Figure 1: Hydrogen Mobile Economy Overview Error! Reference source not found.

Hydrogen technologies are very attractive mainly because of their broad application range. One of the most promising application outside the automotive industry is then the possibility of use of hydrogen as a “stabilization” of electrical grids with the goal of solving the problem of storing the overproduction of electrical energy¹¹.

From the global point of hydrogen related research, there are 4 main fields of interest: hydrogen production (from fossil and renewable sources), hydrogen storage (physical/chemical ways), hydrogen use (fuel cells and combustion engines) and hydrogen infrastructure (on site/off site production, pipeline systems etc.). The contribution will focus now on two of the topics - hydrogen storage (author's bachelor thesis topic) and hydrogen production (author's master thesis topic).

2.1 Hydrogen Storage

The position of hydrogen storage technologies in the value chain of hydrogen economy (see Figure 1) is located in the core of the hydrogen economy. Without an effective and proper possibility to store produced hydrogen, the development of related technologies can't be effective too. For this reason hydrogen storage represents one of the main drawbacks of the hydrogen economy concept. There are two main areas and 8 sub-areas in today's research of the storage possibilities (see Figure 2). The areas are physical-based storage (compressed gas, liquefied gas, cold/cryo compressed gas) and material-based storage (high-porosity materials – adsorbents, organic liquids and interstitial, complex and chemical hydrogen). There is also one more subgroup inside the metal hydrides, called structural hydrides that can be represented e.g. by MgH₂ hydride. From the point of the state of the art of each technology, the compressed gas storage and liquefied gas storage can be seen as a mature technologies for mobile application together with semi-mature technologies of structural (metal) hydrides for stationary applications. The rest of the technologies is still in the experimental development⁷.

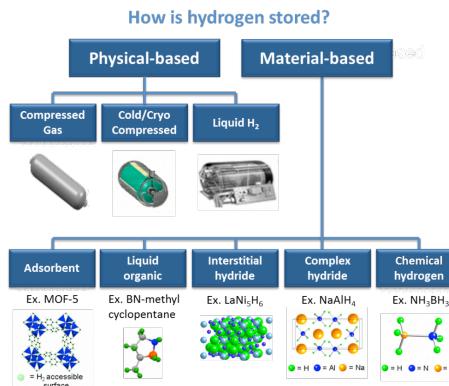


Figure 2: Hydrogen Storage Possibilities¹²

The parametric analysis of main hydrogen storage possibilities are listed in the Table 1. Each of the possibilities has its advantages and drawbacks. The compressed gas technology is very useful as a contemporary hydrogen storage option because of the maturity of the technology but in the long term, there is only not a sufficient energy in the tank to be able to drive same range of kilometres as with conventional fuels. On the other side, the structural (metal) hydrides are too heavy to become a mobile hydrogen storage option, but for the stationary application it can be useful. For this reason, there is a necessity to think about the use of particular technology together with the application needed^{7, 13}.

Table 1: Hydrogen storage possibilities parametric analysis^{7, 13}.

Type of storage Parametre	Compressed gas	Metal hydrides			Chemical hydrogen	Adsorption
		Structural	Interstitial	Complex		
Gravimetric capacity	x	-	x	ok	ok	ok
Volume capacity	x	ok	ok	ok	ok	-
Regeneration	ok	-	ok	-	x	ok
Thermodynamics	ok	x	ok	-	-	x
Kinetics	ok	ok	ok	x	-	ok
Effectivity	ok	ok	ok	-	x	ok

2.2 Hydrogen Production

The hydrogen production topic is very closely related with the overall goal of hydrogen economy itself. The concept of hydrogen economy is based on the effort to fulfill these two goals. The first is to reduce the dependency on fossil (non-renewable) sources, thus the hydrogen should be produced from renewable sources. The second goal is related to the concern for how the production is accomplished and used for different applications, because only possibility for enabling sustainable growth and to stop negative impact on the environment through the implementation of hydrogen technologies is to produce hydrogen by environment-friendly methods¹⁴.

There are several alternatives how to produce hydrogen today. Some of them are based on fossil sources others are renewable-based. The contemporary trend towards the green economy favors as expected the use of renewable sources for the production of hydrogen, but from the point of view of the current situation in the hydrogen market, the production from fossil fuels will be still dominant for a longer period of time, especially for the possible transition period from carbon-based to low-carbon based economy^{7, 14}.

The general scheme of hydrogen production technologies can be seen on Figure 3.

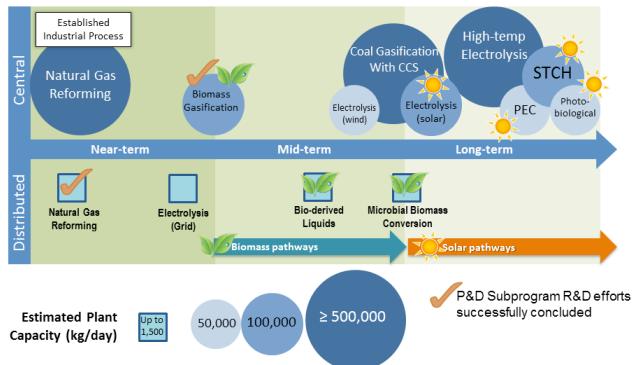


Figure 3: Hydrogen Production TechnologiesError! Reference source not found.

As evident from the Figure 3, there is a same conceptual question towards the use of particular hydrogen production technology as it is with the use of hydrogen storage possibilities. Firstly the implementation of any of these technologies should be considered with respect to planned used, because there are several infrastructural points, which have to be optimized for particular use.

The already established technologies of today are natural gas reforming, biomass gasification for central production plants and natural gas reforming together with semi-mature technology of electrolysis (connected to grid) for distributed production. The rest of the technologies is still in the experimental or basic research development, but there is some substantial progress in these areas in recent years¹⁵. Author's master thesis was focused on the basic research in the area of photocatalytic water splitting. The primary focus was on the production of hydrogen based on photocatalytic water splitting in the presence of semiconductor materials (especially modified and unmodified TiO₂). The aim of the thesis was to synthesize a nanostructured oxide, graphene/graphene oxide particles and its composites and to study its structures and photocatalytic properties regarding photolysis of water. Products of the syntheses were described from the point of view of phase composition, surface area and photocatalytic activity. The main output of the thesis is a discussion of the influence of alkaline complex forming reagents on the hydrothermal low-temperature synthesis of biphasic TiO₂, and a study of the influence of graphene/graphene oxide modification on photocatalytic activity of biphasic TiO₂¹⁴.

The thesis was also focused on the synthesis of new material called graphene. This material is very often named as "wonder material" or "material of future" and can among other fields also revolutionize hydrogen technologies towards real-world applications. Some of the results of coupled approached of graphene mixed with already existing hydrogen technologies are already under extensive research and represent a great promise for the future^{16, 17}. The importance of graphene (the first 2D material) can be seen especially in the context of European Union, because graphene became one of the funded flagship initiatives of Future and Emerging Technologies called "Graphene Flagship". There is 1 billion Euro to spend on graphene research between 2013 and 2023 because of

this flagship¹⁸. In addition to this the home of Graphene, where graphene was firstly isolated – Manchester (University of Manchester) – is also located in European Union¹⁹.

2.3 Hydrogen Technologies in Europe

The historical point marking the beginning of intensive research of hydrogen technologies in the European Union was at 2003, same time like in the USA. The memorandum of international cooperation in research and development between EU and USA in the field of hydrogen technologies was signed in that year²⁰. Because of this The European Hydrogen and Fuel Cells Technology Platform was founded. The new institution was responsible for the basic analysis of European approach towards hydrogen technologies and for the preparation of strategic documents for the future development in this field⁷. The basic strategic document derived from this initiative was created and named as "Strategic Research Agenda"²¹. This document set among other topics the initiative to create national hydrogen technology platforms in the whole EU (Norway, Lithuania, Czech Republic, etc.). In 2008 The European Hydrogen and Fuel Cells Technology Platform was substitute by new entity called Fuel Cell and Hydrogen Joint Undertaking (FCH-JU)^{7, 22}. FCH-JU basic objective is to connect all mayor players of European hydrogen research and to develop suitable environment for the development of these technologies. FCH-JU is also part of so called „SET-Plan“ (European Strategic Energy Technology Plan)²³. This document represents the overall document for the energy related strategic topics and establishes the activities of FCH-JU in the context of another European strategic document (white paper) for new transport system called „Roadmap to single European transport Area – Towards a competitive and resource efficient transport system“ from 28. 3. 2011, where hydrogen technologies are one of the first choice towards the goals of the strategic document²⁴. This trend is also supported by the communication of European Commission from 24. 1. 2013 about the European strategy for alternative fuels^{7, 25, 26} and the new European directive²⁷.

The leading countries of hydrogen technologies incorporation in Europe are Germany, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland and northern countries together with Iceland²⁸. The overall support in the EU for the development and use of hydrogen technologies are very positive and more broader applications of these technologies started already from 2014 (together with new calls of European funding mechanism, where the local authorities are supported to incorporate the hydrogen technologies in local energy strategies). There is a prevision of substantial increase of use of hydrogen cars in 2025²⁵. The most well-known demonstration project of hydrogen technologies in EU is probably the project called „HyFleet:cute“, that enabled the use of hydrogen buses in 10 largest cities in Europe^{7, 29}.

3 WWTP as a Biorefinery

The final part of the contribution focuses on the author's topical field of the study that is the concept of a wastewater plant (WWTP) as a "biorefinery", which is also the topic of author's Ph.D. studies. The main area of discussion is going to be devoted to the

topic of WWTP as a possible future renewable energy source through the production of biogas and biohydrogen.

3.1 Topicality of the project

The importance of author's Ph.D. project is reflected in the necessity for finding a new solutions for modern towns and cities towards the long-lasting sustainable growth based on effective resource management and use of renewable energy sources such as biomass. This trend is clearly visible in the new modern megacities such as Singapore or Soul or in the states with proactive green policy towards "SMART" solutions for regional infrastructure. In light of SMART approaches to sustainable development, there is a clear trend in energy and substance optimization of wastewater treatment plants (WWTPs). This trend is especially reflected with respect to PE (population equivalent) as a specific mensural unit for energy needed for wastewater disposal for one person, where there is approximately 15–20 % of energy loss on every inhabitant as was discussed for example at IWA (International Water Association) Conference in Prague in the start of September (2015)³⁰. Together with energy optimization is also very important to optimize the substance flows at WWTPs.

The Ph.D. project beside the energy and substance optimization focuses also on another important topic, that is the development of hydrogen economy as one of the leading energy variants for the future, especially in the Czech Republic (the importance of this issue is also reflected in the actualized State National Energy Concept together with the proof, that biomass as a renewable energy is one of the major sources)³¹. Last (but) not least, the topic is important from the point of the possible change of the paradigm of perception of WWTPs as non-important infrastructure serving only like a "filter" on the roadmap of modern cities towards the idea and presentation of WWTPs like modern technological facilities that produce valuable resources.

Thus the main overall goal of the project is raw (energy) material optimization of WWTPs with the use of modern sensors, modelling software and new technologies and to broaden the new approaches towards practical applications especially in the Czech Republic as a biomass sources are suitable to be locally optimized. The topicality of the project is also reflected in the new ways of funding opportunities in the European Union for the period 2016–2020.

3.2 Goals and Original Output:

The main goal of the project is the development of particular method for validation of new possibilities of energy production and optimization from wastewater sources from the technologies of WWTPs and the place of available biodegradable waste as a source for biogas and biohydrogen. The main original output of the project should be application, extension and modification of general models for mathematical modelling of WWTPs for optimization of biogas and especially biohydrogen production.

3.3 Theoretical background

The WWTPs as a renewable sources of energy are discussed for a long period of time, but only recent development and new technologies available enabling the hidden

potential of this approach³². The starting point of the project, as discussed above, is the creation of methods and guidelines together with broadening of the knowledge of mathematical modelling and process optimization of WWTPs. The project comes in the symbolical period time, when it is more than 25 years since the presentation of first unified model for simulation of activated sludge (Activated Sludge Model 1 – ASM1) developed by the task group of International Water Association (IWA)³³. With respect to this historical point, the specialized book “Application of Activated Sludge Models” was published, that sums up the theoretical knowledge up to present days and sets the trends for the future. The use of mathematical modelling for the optimization of activated sludge processes for biological removal of macronutrients can be taken as verified and modern tool for WWTP administration, because the unified models presented by IWA fostered and speeded up the development of such tools. For that reason the proposed project is going to be based on verified models and build upon on it, but what it still missing and it is under current development is so called. “plant-wide” simulation models, that would enable to work with the operational plant as a one big complex and hopefully in the future also to simulate the sewer system together with WWTP. Under the cited “plant-wide” concept of simulation belongs also the use of WWTP as a renewable source of energy, because processes governing the activated sludge treatment are based on different principles than anaerobic digestion of biogas and biohydrogen. For this reason is necessary to find new and to verified current models for the new usage and investigate possible new extensions or alterations (e.g. to find an optimal ASM/ADM model connection of variables, ADM = Activated Digestion Model)³⁴. The field of simulation is specific in the point, that all proposed solutions have to be verified with sufficient number or real time results, to being able to validate the theoretical concepts. Thus is important in this field to have the possibility of real-world application of the concept, that can't be usually easily simulated in the laboratory environment³⁵. For these reasons, the importance of all the participating partners should be emphasized, because without this cooperation, the project would not be able to come into existence.

In this context it is also important to point out that the basic theoretical starting point of these models is not the maximum complexity, but primarily its overall simplicity and usefulness that can be reached only by the intersection of empirical and theoretical knowledge³⁴. As professor Ollson says in his new book, “Water and Energy: Threats and Opportunities – Second Edition”, only the latest development of the technology enabled us to fully make use of theoretical possibilities of optimization thanks to every time increasing level of computational hardware and thus we are able to thing about new type of application of modelling software as optimization of WWTP together with the focus on energy neutrality or even energy positivity output³². Both the production of biogas and biohydrogen belongs to the renewable resources that are gentle towards the environment and for this is necessary to take them into consideration for overall energy production strategy⁴. The prove for this argument can be found also in the study of National Laboratory of Renewable Resources (NREL, USA), that describes the connection between the possibilities of biogas and biohydrogen production with respect to the biomass availability in the USA³⁶.

Regarding the theoretical background, the project should develop a new knowledge regarding these fields:

1. Energy and substance optimization of WWTPs
2. Practical development of new hydrogen technologies
3. Development of mathematical modelling of WWTPs
4. Optimization and validation of proposed method by the WWTP plant operator partner

4 Conclusion

The contribution presented a topical overview of part of the hydrogen economy within the context of European Union. The author hopes that this brief summary can be useful as a quick opening guidance in the area of hydrogen technologies. To conclude the author would like to express his personal opinion about hydrogen technologies. The author thinks that from the social point of view hydrogen economy leads to the path towards so called "City 2.0" that represents a new form of effective, ecological and gentle cities.

5 References

1. MAREK, Jiří a Juraj KIZLINK. *Globální trendy v použití vodíku jako paliva*. 2013, 5 (5). Available at: <http://energie21.cz/globalni-trendy-v-pouziti-vodiku-jako-paliva>
2. TOLLEFSON, Jeff. *Hydrogen vehicles: Fuel of the future?*. Nature, 2010, (464): 1262-1264. DOI: 10.1038/4641262a. Available at: <http://www.nature.com/news/2010/100429/full/4641262a.html>
3. About. TEDCity2.0. Available at: <http://www.tedcity2.org/about/>
4. KENNES, Christian a Maria VEIGA. Air Pollution Prevention and Control: Bioreactors and Bioenergy. John Wiley & Sons, Ltd, 2013, p. 573. ISBN: 978-1-119-94331-0
5. JANÍK, Luděk, Aleš DOUCEK a Petr DLOUHÝ. Strategická výzkumná agenda. Česká vodíková technologická platforma (HYTEP). 2010. Available at: http://www.hytep.cz/images/dokumenty-ke-stazeni/SVA_HYTEP.pdf
6. Bouzek K., Janík, L., Doucek A., Dlouhý P.: Implementační akční plán rozvoje vodíkového hospodářství v ČR, HYTEP, Řež 2012, Available at: http://www.hytep.cz/images/dokumenty-ke-stazeni/Hytep_IAP_2012_02_27.pdf
7. MAREK, Jiří. Možnosti skladování vodíku pro jeho využití v dopravě. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 52 p. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Juraj Kizlink, CSc. Available at: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=63796

8. JOINT Press Release, 12th November 2014 12:15: European bus manufacturers and leading mayors step up. *Fuel Cells and Hydrogen Joint Undertaking (FCH JU)*. 2014. Available at: <http://www.fch.europa.eu/sites/default/files/Joint%20press%20-%20release%20-%20zero-%20emission%20buses.pdf>
9. Toyota Mirai: Fuel Cell Vehicle. *Toyota*. 2015. Available at: <https://ssl.toyota.com/mirai/fcv.html>
10. DEVELOPMENT OF A HYDROGEN REFUELING STATION NETWORK. *National Organisation Hydrogen and Fuel Cell Technology*. 2015. Available at: <https://www.now-gmbh.de/en/nationales-innovationsprogramm/aufbau-wasserstoff-tankstellennetz>
11. VLČKOVÁ, Eva. Vodík jako úschovna energie. *Česká vodíková technologická platforma*. Lidové noviny, 2015. Available at: <http://www.hYTEP.cz/cz/clanky/kategorie-clanku/clanky/587-vodik-jako-uschovna-energie>
12. HYDROGEN STORAGE. ENERGY.GOV: *Office of Energy Efficiency and Renewable Energy*. b.r.. Available at: <http://energy.gov/eere/fuelcells/hydrogen-storage>
13. YANG, Jun., SUDIK Andrea. WOLVERTON Christopher. et al.: High capacity hydrogen storage materials: attributes for automotive applications and techniques for materials discovery. *Chemical Society Reviews*. 2010, vol. 39, issue 2, p. 656-675. DOI: 10.1039/b802882f. Available at: <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2010/CS/b802882f#!divAbstract>
14. MAREK, Jiří. Fotokatalytický rozklad vody oxidovými polovodiči modifikovanými grafenem/grafenoxidem. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 60 p. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Jaroslav Cihlář, CSc. Available at: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=99956
15. HYDROGEN PRODUCTION. ENERGY.GOV: *Office of Energy Efficiency and Renewable Energy*. Available at: <http://energy.gov/eere/fuelcells/hydrogen-production>
16. *Graphene-based Energy Devices*. John Wiley & Sons, Ltd. 2015. p. 464. ISBN: 978-3-527-33806-1.
17. TOZZINI, Valentina a Vittorio PELLEGRINNI. *Prospects for hydrogen storage in graphene*. Royal Society of Chemistry, 2012, (15): 80-89. DOI: 10.1039/C2CP42538F. Available at: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/cp/c2cp42538f#!divAbstract>
18. ELÉHN, Christophe. About Graphene Flagship. *Graphene Flagship*. 2015. Available at: <http://graphene-flagship.eu/project/Pages/About-Graphene-Flagship.aspx>
19. Home of Graphene: Graphene, Manchester's Revolutionary 2D Material. *The University of Manchester*. 2015. Available at: <http://www.graphene.manchester.ac.uk/>
20. Joint Statement by European Council President Costas Simitis, European Commission President Romano Prodi and U.S. President George W. Bush on the Hydrogen Economy. EU Greek Presidency 2003: News: EU-USA Summit: Joint Statement on the Hydrogen Economy, Washington, 25/03. 2003. Available at: <http://www.eu2003.gr/en/articles/2003/6/25/3157/>

21. Strategic Research Agenda. *European Hydrogen and Fuel Cell Technology Platform*. 2005. 123 p. Available at: http://www.fch.europa.eu/sites/default/files/documents/hfp-sra004_v9-2004_sra-report-final_22jul2005.pdf
22. Who we are. *Fuel Cells and Hydrogen Joint Undertaking (FCH-JU)*. Available at: <http://www.fch.europa.eu/page/who-we-are>
23. Towards an Integrated Strategic Energy Technology (SET) Plan: Accelerating the European Energy System Transformation. *European Commission*. In: COM: C(2015) 6317 final. 2015. Available at: https://ec.europa.eu/energy/sites/ener/files/documents/1_EN_ACT_part1_v8_0.pdf
24. WHITE PAPER Roadmap to a Single European Transport Area – Towards a competitive and resource efficient transport system. *European Commission*. In: COM 2011 (144). 2011. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:52011DC0144&from=EN>
25. EU launches clean fuel strategy. *European Commission*. 2013. Available at: http://europa.eu/rapid/press-release_IP-13-40_en.htm
26. COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT, THE COUNCIL, THE EUROPEAN ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE AND THE COMMITTEE OF THE REGIONS Clean Power for Transport: A European alternative fuels strategy. *European Commission* In: COM 2013 (17) final. 2013. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2013:0017:FIN:EN:PDF>
27. DIRECTIVE 2014/94/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 October 2014 on the deployment of alternative fuels infrastructure. *European Parliament*. 2014. 20 p. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014L0094&from=EN>
28. STOLTEN, Detlef. Hydrogen and Fuel Cells. *John Wiley & Sons, Ltd*, 2010, 908 p. ISBN 978-3-527-32711-9.
29. What is HyFleet:CUTE?. *HyFLEET:CUTE*. Available at: <http://www.global-hydrogen-bus-platform.com/www.global-hydrogen-bus-platform.com/index.html>
30. IWA Conference on Large Wastewater treatment plants. 2015. Available at: <http://lwwtp2015.org/>
31. STÁTNÍ ENERGETICKÁ KONCEPCE ČESKÉ REPUBLIKY. *Ministerstvo průmyslu a obchodu*. 2014. 145 p. Available at: <http://download.mpo.cz/get/52826/60155/632395/priloha004.pdf>
32. OLSSON, Gustav. Water and Energy – Threats and Opportunities – Second Edition. *IWA Publishing*, 2015, 496 p. ISBN 9781780407326

33. BRDJANOVIC, Damir., MEIJER, S.C.F., LOPEZ-VAZQUEZ, C.M. et al. Applications of Activated Sludge Models. *IWA Publishing*, 2015. 500 p. ISBN 9781780404639
34. VAN LOOSDRECHT, M.C.M., LOPEZ-VAZQUEZ C.M., MEIJER, S.C.F. et al. Twenty-five years of ASM1: past, present and future of wastewater treatment modelling. *Journal of Hydroinformatics*. 2015, 17, (5): 697–718. DOI: 10.2166/hydro.2015.006. Available at: <http://jh.iwaponline.com/content/17/5/697>
35. IWA Task Group on Good Modelling Practice: Rieger, Leiv., Gillot, Sylvie., Langergraber, Guenter., et al. Guidelines for Using Activated Sludge Models.: *IWA Publishing*, 2012, 312 p. ISBN 9781843391746
36. SAUR, Genevieve, MILBRANDT, Anelia. NREL: Renewable Hydrogen Potential from Biogas in the United States. 2014, 33 p. Available at: <http://www.nrel.gov/docs/fy14osti/60283.pdf>

Processing and characterization of long flax/thermoset biocomposites with modified interphase

Přemysl Menčík

Radek Přikryl, Filip Hahn, Emil Letavaj

Brno University of Technology,

Faculty of Chemistry

Institute of Materials Chemistry

Purkynova 464/118, 612 00 Brno, ČR

xcmencik@fch.vutbr.cz

1 Introduction

Polymer composites with fiber reinforcements are widely used as construction materials. Nowadays most of the fibers used in polymer composite industry are synthetic ones, like glass, aramid or carbon fibers. They are widely used especially for their high stiffness and strength properties. However, due to growing ecological and economic awareness, green materials have been developed. Typical examples of green materials are natural fibers. There are lots of types of natural fibers and most of them are readily available with usable mechanical properties¹.

Nevertheless, because of hydrophilic surface, natural fibers are not compatible with the majority of polymer matrices. This causes ineffective stress transfer across the fiber-matrix interface. Possible solution of this problem can be the surface treatment of fibers². Fiber surface polarity can be changed by introducing specific functional groups prepared by grafting technologies. This kind of treatment can improve the fiber – matrix compatibility and leads to an improvement of composite mechanical properties and reduction of water absorption. Moreover, better wettability of fibers by matrix opens the door for new technologies of natural composites preparation.

The aim of this work is to prepare polymer composites of desired mechanical properties with low-twisted flax fiber reinforcement by the pultrusion process. Several chemical treatments of the flax fibers were tested³.

2 Materials and Methods

2.1 Used materials

As the reinforcement low twisted flax fibers rowings supplied and treated by NaOH solution by Safilin (Poland) to remove the pollutants were used.

Used polyester matrix was based on isophthalic resin ISO 112-G (Poliver - Italy), vinyl ester matrix was based on vinyl ester – epoxy resin Derakene 470-HT (Ashland - USA). The curing reaction was initiated by benzoyl peroxide, bis(4-tert-butylcyclohexyl) peroxydicarbonate and tert-butyl peroxybenzoate.

The surface analysis of the flax fibers was performed by Scanning Electron Microscopy (EVO LS 10, Zeiss). The elemental composition of tested samples was determined by Energy-dispersive X-ray (EDS) detector.

The tensile properties were tested by Instron 5985 equipped with the extensometer. The flexural properties were tested by Zwick Z010 and the impact strength was measured by Labtest CHK 50J-I.

Water absorption of the composite samples was tested according to ISO 62 standard. Three samples of each tested series were dried for 12 hours at 60°C and their weight after drying was recorded. Those dried samples were immersed in water and their weight was measured until the constant mass value was observed.

2.2 Fiber treatment methods

The wet treatment was used to improve the chemical compatibility with the thermoset matrix. Maleic anhydride (MA), itaconic anhydride (ITA), triethoxyvinylsilane (VS), (3-Methacryloxypropyl)trimethoxysilane (MS) and (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GS) were used as coupling agents.

MA and ITA treatments were carried out by immersing the fibers into acetone with 10 wt. % of appropriate anhydride. The solution was boiled 60 minutes. Treated fibers were rinsed in acetone and dried at 70 °C for 12 hours.

Silane fiber treatments VS, MS, GS were performed in an ethanol/water mixture in a volume ratio 4:1 with 3 wt. % of appropriate silane. The pH 4 adjustment of prepared solutions was arranged by acetic acid. The fibers were immersed in the solutions and heated until the solutions started to boil. The solutions with fibers were cooled down to laboratory temperature after 2 hours of boiling and the fibers were rinsed twice by cool solvent. Treated fibers were dried in a dry box at 70 °C for 12 hours. The nomenclature of tested samples is described in Table 1.

Table 1: Nomenclature of the samples

Designation	Meaning
UP	Polyester resin
VE	Vinyl ester resin
Ref	Fibers treated by NaOH from supplier. Raw material for all other treatments
MAF	Fibers treated by maleic anhydride
ITAF	Fibers treated by itaconic anhydride
VSF	Fibers treated by triethoxyvinylsilane
MSF	Fibers treated by (3-Methacryloxypropyl)trimethoxysilane
GSF	Fibers treated by (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane

2.3 Specimen processing and preparation

Natural composite profiles were prepared by the pultrusion process using the experimental pultrusion device developed at the Brno University of Technology. During this process the flax fibers were impregnated by thermoset resin and pulled into heated steel die, where the material was shaped into rectangular profile and cured at two temperature zones 100 and 160 °C. The pulling speed was set to 0.25 m min⁻¹. At the end of this process the final material was cut to specific length required by ASTM testing standards.

3 Results and discussion

Chemical treatments of natural fibers are used to improve the chemical interaction between polymer matrix and fiber reinforcement and to reduce the sorption and diffusion of water molecules into the structure of natural fibers as well⁴.

3.1 Tensile and Flexural properties

Prepared composite samples were tested by tensile and flexural tests. In Figure 1 the tensile modulus of elasticity ΔE and the tensile strength $\Delta \sigma$ are described (treated fibers value/untreated fibers value). The improvement of tensile modulus for MAF and ITAF samples with both matrixes was observed from the results of tensile test. Recent improvement of tensile modulus was also observed for all samples treated by silanes, but it was not as high as for the samples with MAF or ITAF. On the other hand we can see massive decrease of tensile strength for MAF and ITAF samples. MSF and GSF samples show no (or not significant) decrease of tensile strength. For VSF-VE and VSF-UP samples lower values of tensile modulus and strength were measured compared to other silane treatments.

Very similar data were measured by the flexural test. The samples with MAF, respectively ITAF showed reduced flexural strength and increased flexural modulus for both matrixes. MSF samples also showed similar trend to GSF samples and VSF had no effect on the improvement of flexural properties.

Because of the destructive effect of MA and ITA treatments and no effect of VS treatment on the mechanical properties of fibers, further attention was focused on the MS and GS treatments.

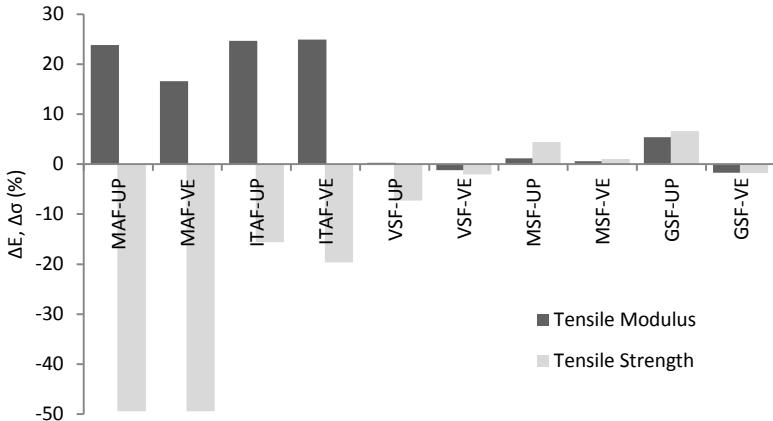


Figure 1: Tensile test results of the treated fibers with UP or VE matrix compared to the reference.

3.2 SEM and XPS analysis

The SEM analysis was performed as a surface analysis for the flax fibers treated by MS and GS. The attention was focused on the silane layer structure. In Figure 2 the detail of the flax fiber treated by MS is shown. The surface of the fiber is rough and covered by separated areas of silane multilayer. However, treated fibers are not covered fully by consistent silane monolayer, as was expected. This effect is even more pronounced on fibers treated by GS, described in Figure 3. There are evident multilayer areas of GS on the surface of the fiber. Moreover, those multilayers are more non-consistent, full of defects and more rough than the MS layer.

The silane-origin of the areas was confirmed by the elemental XPS analysis via EDS detector. This method detected several mass percent of Si atoms, which does not correspond to common content of the flax fibers. For MS higher content of C atoms from methacrylate functional groups was detected. For GS an increasing content of O atoms due to glycidyl functional end group of the silane chain was detected.

3.3 Impact toughness

Another method for testing the interphase quality, performed on the samples with MSF and GSF was the Charpy impact test. The results of the UP and VE samples with MSF and GSF were compared to those of samples with untreated Ref fibers. The MSF-UP and MSF-VE samples showed the decrease of the impact strength up to 7 % and 11 %, respectively. On the other hand the GSF-UP and GSF-VE samples gave the values of impact strength higher up to 11 % and 12 %, respectively, compared to the reference.

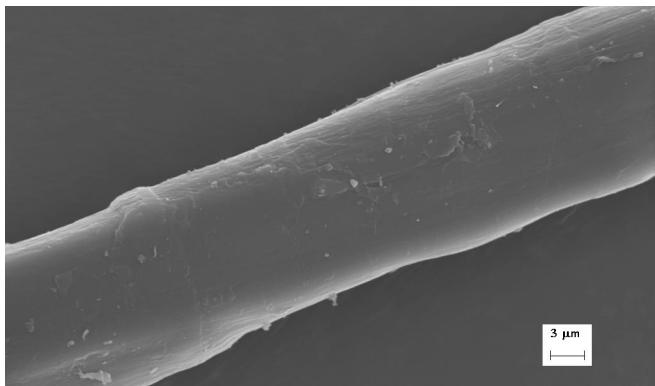


Figure 2: Flax fiber treated by MS: EHT=15kV, WD=12mm, Mag=5000x

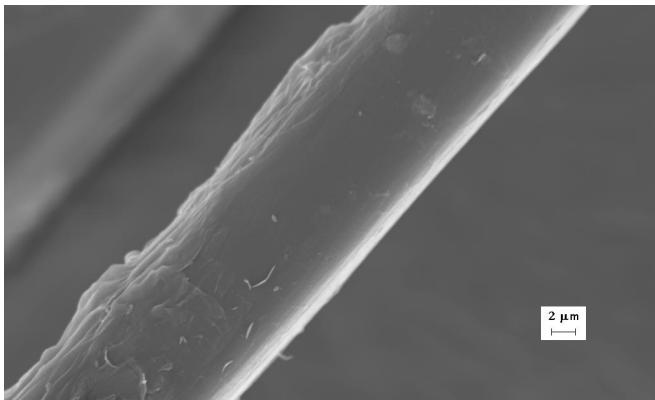


Figure 3: Flax fiber treated by GS: EHT=15kV, WD=12mm, Mag=5000x

3.4 Fiber volume fraction effect

The flexural and tensile properties of the composites were investigated as a function of the fiber volume fraction. For this experiment UP composite with Ref fibers was chosen. In the graph of flexural properties shown in Figure 4 an increase of the flexural modulus with fiber volume fraction is evident. The flexural strength increases with the volume fraction up to 63 vol. % of the fibers. Beyond this value, at higher volume fraction, the flexural strength is constant, or slightly decreases. A similar trend was observed also for the measurements of tensile properties.

3.5 Water absorption test

One of the effects of the surface treatment should also be the reduction of water absorption. The time-dependencies of the water absorption for the Ref-UP and Ref-VE samples were very close to each other, and can be taken as a reference for the test of composite water absorption. Better results of the water resistance were reached for the

GSF-UP samples (not displayed) and the best result, the lowest increase of the samples weight, was observed for the MSF-UP composite. Slightly worse water resistance was shown by MSF-VE samples compared to the reference (not displayed). The highest water absorption results provides GSF-VE composite sample. The results discussed above are displayed in Figure 5.

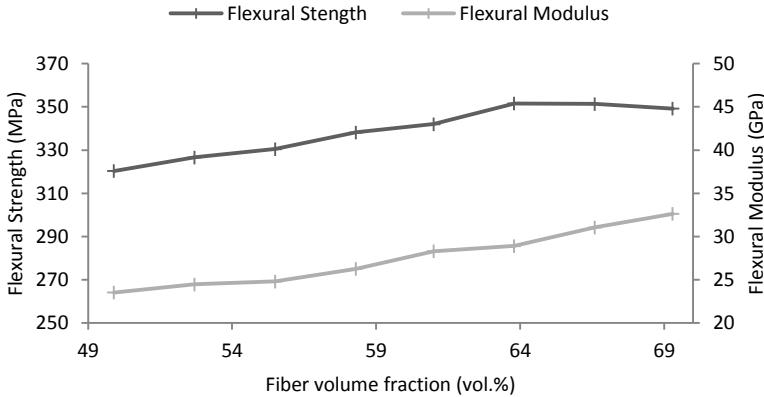


Figure 4: Flexural properties of the Ref-UP composite as a function of the fiber volume fraction

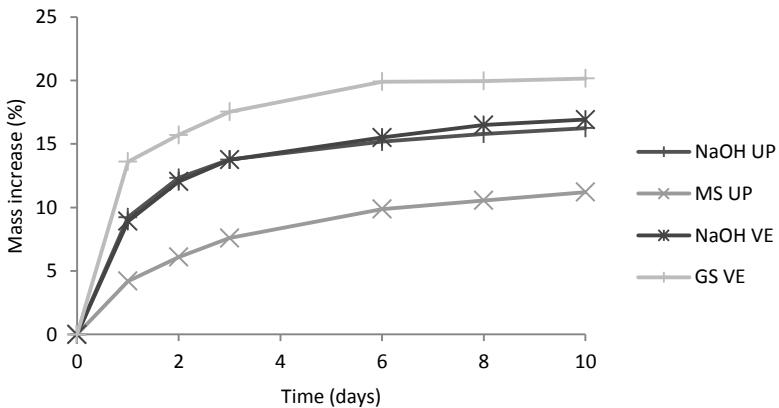


Figure 5: Time dependence of water absorption

4 Conclusion

The flexural and tensile tests were performed on prepared composite samples. From the results we can deduce some improvement of the composite interfacial compatibility for MSF and GSF and no improvement for VSF for both matrixes. MAF and ITAF improve

the compatibility much more than silane coupling agents, but they strongly damage the fibers. The tensile strength of those fibers is lower and from this reason the improvement of interfacial compatibility cannot race up the composite strength. Since GSF provides worse mechanical properties compared to MSF, the methacrylate group is much more suitable for used UP, respectively VE matrix.

The SEM photographs show non-consistent silane multilayers and separated silane areas. This is because of a non-optimal method of treatment for flax fibers. Those small silane areas shows only slightly improved mechanical properties described earlier as well. With better treatment procedure much better properties of the composites with MSF and GSF can be expected.

The improvement of the interphase interaction in the composite leads to the increase of brittleness and to the decrease of impact strength. The decrease of the impact strength for the MSF-UP and MSF-VE samples means better coupling properties of MS for Flax-UP or VE composites.

The results of the fiber volume fraction effect on the mechanical properties show the value of 63 vol. % as an optimum. Below this value the flexural and tensile properties increase with increasing fiber fraction and above 63 vol. % the properties are constant or, even, worse. At higher volume of fibers the matrix saturation is insufficient for an effective transfer of the outer stress into the fibers. Moreover, low matrix content cannot perform its bonding function.

The decrease of water absorption should be one of requested achievements of the fiber treatment. MSF-UP composite samples provide the lowest values of water absorption. On the other hand, GSF-VE samples even increase the water absorption compared to the reference.

The most effective and useful fiber treatment method appears to be the MS treatment combined with UP matrix and containing 63 volume % of the fibers reinforcement.

5 References

1. Kalia S., Kaith B. S., Kaur I., *Cellulose fibers: bio- and nano-polymer composites*, part. 1, (4). Springer, New York (2011).
2. Kabir M. M., Wang H., Lau K.T., Cardona F.: *Composites: Part B*, 43, 2883 (2012).
3. Menčík, P.; Příkryl, R.; Hahn, F. In *Proceedings of the 2nd International Conference on Chemical Technology*. 1. 2014. p. 303–308. ISBN: 978-80-86238-64-7.
4. Mishra, S., J.B. Naik, Y.P. Patil. T. *Composites Science and Technology*. 2000; 60 (9) 1729.

This work was supported by Safilin company (www.safilin.pl) and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, Project No. LO1211.

Screen Printing of Organic Electrochemical Transistor for Cardiomyocytes Research

Lukáš Omasta, Ota Salyk, Martin Vala, Martin Weiter

*Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Physical and Applied Chemistry
Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic
xcomastal@fch.vutbr.cz*

1 Introduction

The growing area of bioelectronics, which links the fields of electronics and biology, holds immense potential for the development of innovative biomedical devices for therapeutics and diagnostics. Device with great potential which arise from this field is the organic electrochemical transistor (OECT). Since the invention of OECT by White et al. (1984) [1] as a variant of the OTFT (Organic Thin Film Transistor) it became a promising device for biocompatible sensors in biology and medicine. Biosensors arose as a promising solution for the investigation of processes in cells and tissue cultures *in vitro* as well as for diagnostic and therapy *in vivo*. OECTs are designed to convert the electrochemical processes at cell membranes to electronic signals. The study of cardiomyocytes evident pulsing in sensors consisting of interdigital gold electrodes in cultivation well was presented by Wang et al. [2]. Application of organic electronics brings the new approach for sensing in biology and medicine. The main part of the device is a transistor, nowadays mostly based on PEDOT:PSS (poly(3,4-ethylenedioxythiophene polystyrene sulfonate) conductive polymer, due to its outstanding biocompatibility and potentially high device amplification. The theory of its function was completed by Bernard and Malliaras in 2007 [3]. PEDOT:PSS is suitable due to its high amplification defined by OECTs transconductance [4] short time response and wide frequency range, up to a few kHz [5] used for ECG (Electro Cardio Gram) recording. Dimensions of OECT can be optimized for setting of the working point with maximum transconductance at zero gate bias [6].

Technology of printed OA (Organic Electronics) brought the possibility to print biosensor on biocompatible polymer foils such as PET (Poly(Ethylene Terephthalate)) or PEN (Poly(Ethylene 2,6-Naphthalate) enabling processing at higher temperatures. Basirico et al. [7] used ink-jet printing technique for production of fully printed lateral OECTs. Highest achieved amplification at zero gate bias was reached in the case of much larger gate electrode area compared to the channel. The gate electrode is generally linked to the PEDOT:PSS channel via electrolyte containing sodium and potassium ions. Screen-printed OECTs were manufactured in the work of Mannerbro et. al. [8]. Printed hydrogel electrolyte was also used by several researchers [5, 6]. The most frequently used solution for processes containing living cell is 0.01 M PBS (phosphate buffered saline) with pH = 7.4 and its derivatives. According to the experimental data the recommended size of the gate electrode should be larger than the active channel area. In this case the ionic

current is controlled by the channel-electrolyte interface which has larger impedance. Under these conditions it is possible to achieve uniform ion de-doping of the PEDOT:PSS channel, which can be also observed via optical absorption spectroscopy [9].

2 Experimental

The structure of conductive polymer PEDOT:PSS used as an active layer of manufactured OECTs is shown in Figure 1. The testing arrangement is depicted in Figure 2. Circuitry as well as the single device patterning is depicted in Fig. 3 left. A matrix of such biosensors depicted in (Figure 3 Right) was prepared by screen printing method. It consists of PEN foil (Figure 3 Left) with printed matrix of biosensors in between PMMA plate and SensoPlate™ 24-Well Glass-Bottom Plate (from Greiner Bio-One). The system is sealed by Sylgard® 184, silicone elastomer tested on biocompatibility and tighten by screws. The printed biosensors consist of OECTs and a circuit wires. Elastomer also isolates the non-biocompatible silver conducting paths from the electrolyte. The OECTs were deposited on PEN foils 0.125 mm thick.

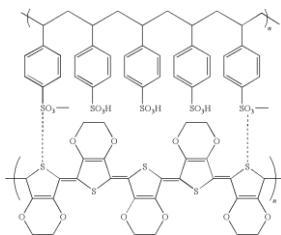


Figure 1: Structure of conductive polymer PEDOT:PSS

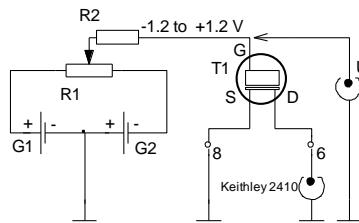


Figure 2: Electrical circuit used for evaluation of OECTs.

Screen printing was carried out by aqueous dispersion of PEDOT:PSS (Clevios S V3) creating layers of thickness 100 to 300 nm and silver conductive paste CB 115 Ag Conductor (DuPont). The system created a bottom of the 16 mm in diameter well for the PBS electrolyte. The gate was 12 × 3 mm and channel in distance 1 mm 16x1 mm. The margins of the pattern were masked by siloxane resin.

The fabricated device was tested in the circuit according to Figure 2. The gate voltage of both polarities was set manually, so the OECT could work in depletion as well

as in accumulation mode with a negative gate bias. The Keithley 2410 SourceMeter includes programmable power source and the data were computer processed by the program LabTracer 2.9.

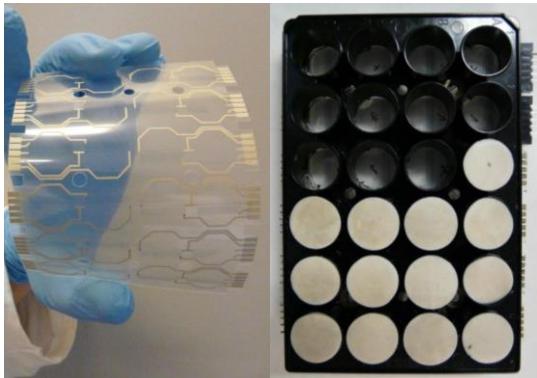


Figure 3: Left: Printed pattern of OEECTs matrix on PEN foil. Right: Encapsulated matrix of biosensors with electrolyte and connectors.

3 Results and Discussion

A series of output characteristics shown in Figure 4, was scanned in range down to $V_{DS} = 1.2$ V. The gate bias from $V_G = -0.6$ V to $V_G = 0.5$ V contains the full possible range from the accumulated de-doped state to the doped depleted state. The doping is understood as a penetration of the alkaline ions into the channel. They act like as a substituents of holes presented in PEDOT:PSS. The charge equilibrium is preserved, but due to the low ion mobility the channel becomes less conductive. The transfer characteristics shows that the steepest rise of the drain current is round $V_G = -0.2$ V. It is quite close to the zero gate bias. This regime is advantageous because it simplifies the device operation and enables to increase the drain potential V_D up to 1.2V, without redox reactions occurring at PEDOT:PSS.

A series of transfer characteristics as in Figure 5 gives the highest transconductance at the vicinity of $V_G = -0.2$ V. The transconductance $g = 100 \mu\text{S}$ at $V_D = -0.5$ V was achieved. More important is the normalized transconductance, which the drain potential effect eliminates, $g_n = g/V_D$, $g_n = 200 \mu\text{S}/\text{V}$. These values are comparable with other printed planar OEECTs [4], although OEECTs patterned by microlithography with gate in the third dimension in electrolyte achieved current I_D up to 1 mA and transconductance $g_n = 4 \mu\text{S}/\text{V}$ [6].

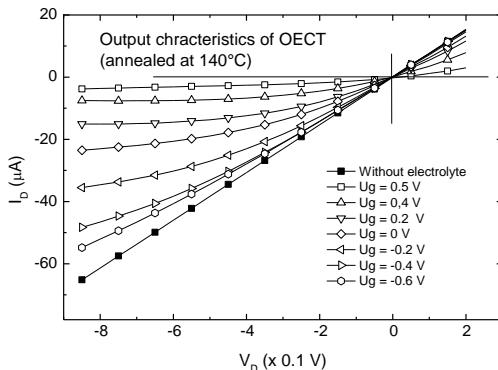


Figure 4: Output characteristics of printed OECT

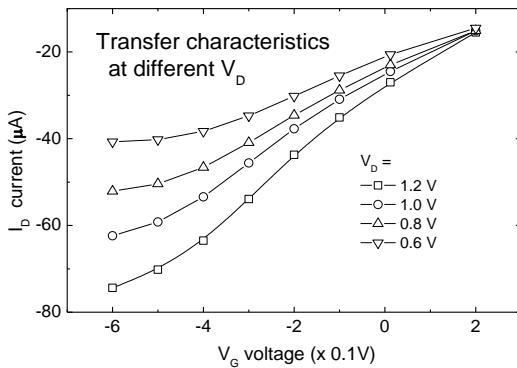


Figure 5: Transfer characteristic of printed OECT

The time response $\tau = 0.2$ s of spike and recovery shape as seen in Figure 6 of the output current I_D is controlled by the holes extraction at the drain electrode and can be damped down by shortening the channel down to a fraction of 1 mm. This is also required for successful cells cultivation. The corresponding time response achieved with 1 mm channel length was 0.07 s

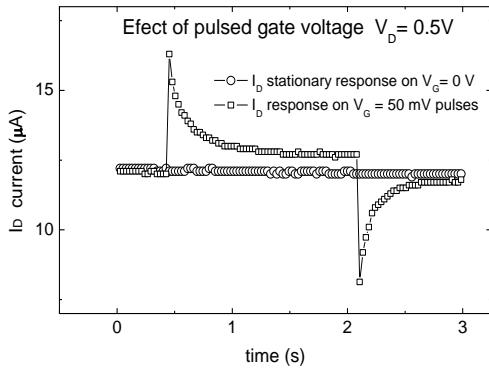


Figure 6: Pulsed voltage $V_G = 50$ mV at zero gate bias and 0.5 V drain voltage V_D

Conclusion

A sensor plate for cardiomyocytes cultivation and observation of their status and pulsing in real time was developed. It consists of the 6×4 matrix of wells for the pabulum as electrolyte and planar printed organic electrochemical transistors (OECTs). It can be used for scanning and demonstration of cardiomyocytes apparent pulsing. Screen print of both the organic semiconductor PEDOT:PSS ink as well as silver conducting paste resulted in reliable operating procedure and final function devices. The main characteristics of OECTs are presented as output and transfer characteristics, the transconductivity and the time-frequency response. The transconductance $g = 100 \mu\text{S}$ and the time constant $\tau = 0.07$ s at zero gate bias $V_G = 0$ V and 50 mV input gate signal was achieved.

5 References

1. WHITE, Henry S., Gregg P. KITTLESEN a Mark S. WRIGHTON. Chemical derivatization of an array of three gold microelectrodes with polypyrrole: fabrication of a molecule-based transistor. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1984, **106**(18): 5375-5377 [cit. 2015-07-24]. DOI: 10.1021/ja00330a070. ISSN 0002-7863.
2. WANG, Tianxing, Ning HU, Jiayue CAO, Jieying WU, Kaiqi SU a Ping WANG. A cardiomyocyte-based biosensor for antiarrhythmic drug evaluation by simultaneously monitoring cell growth and beating. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2013, **49**: 9-13 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.04.039>.
3. BERNARDS, D. A., G. G. MALLIARAS. Steady-State and Transient Behavior of Organic Electrochemical Transistors. *Advanced Functional Materials* [online]. 2007, **17**(17): 3538-3544. DOI: 10.1002/adfm.200601239. ISSN 1616301x
4. KHODAGHOLY, Dion, Jonathan RIVNAY, Michele SESSOLO, Moshe GURFINKEL, Pierre LELEUX, Leslie H. JIMISON, Eleni STAVRINIDOU, Thierry HERVE, Sébastien SANAUR, et al. High transconductance organic electrochemical

- transistors. *Nature Communications* [online]. 2013-7-12, **4**: - [cit. 2015-11-19]. DOI: 10.1038/ncomms3133. ISSN 2041-1723.
- 5. CAMPANA, Alessandra, Tobias CRAMER, Daniel T. SIMON, Magnus BERGGREN a Fabio BISCARINI. Electrocardiographic Recording with Conformable Organic Electrochemical Transistor Fabricated on Resorbable Bioscaffold. *Advanced Materials* [online]. 2014, **26**(23): 3874–3878 [cit. 2015-11-19]. DOI: 10.1002/adma.201400263. ISSN 09359648.
 - 6. RIVNAY, Jonathan, Pierre LELEUX, Michele SESSOLO, Dion KHODAGHOLY, Thierry HERVÉ, Michel FIOCCHI a George G. MALLIARAS. Organic Electrochemical Transistors with Maximum Transconductance at Zero Gate Bias. *Advanced Materials* [online]. 2013, **25**(48): 7010–7014 [cit. 2015-11-19]. DOI: 10.1002/adma.201303080. ISSN 09359648.
 - 7. BASIRICÒ, L., P. COSSEDDU, A. SCIDÀ, B. FRABONI, G.G. MALLIARAS a A. BONFIGLIO. Electrical characteristics of ink-jet printed, all-polymer electrochemical transistors. *Organic Electronics* [online]. 2012, **13**(2): 244–248 [cit. 2014-04-22]. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.orgel.2011.11.010>
 - 8. MANNERBRO, Richard, Martin RANLÖF, Nathaniel ROBINSON a Robert FORCHHEIMER. Inkjet and Screen printed electrochemical organic electronics. *Synthetic Metals* [online]. 2008, **158**(13): 556–560 [cit. 2015-11-19]. DOI: 10.1016/j.synthmet.2008.03.030. ISSN 03796779.
 - 9. BAO, Zhenan, Iain MCCULLOCH, Ruth SHINAR, Ioannis KYMISSIS, Jacob T. FRIEDLEIN, Sean E. SHAHEEN a Robert R. MCLEOD. *Optical method for making spatially and temporally resolved measurements of the hole concentration in organic electrochemical transistors* [online]. : 91851X- [cit. 2015-11-19]. DOI: 10.1117/12.2063564.

Acknowledgement:

This work has been supported by Czech Science Foundation via project No. 13-29358S, research infrastructures was supported by projects MŠMT No. LO1211.

Preparation of Core-shell TiO₂ coated nanosized magnetic particles

Tomáš Solný

Eva Bartoníčková, Jiří Másilko, Petr Ptáček

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Materials Research Centre

Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech republic

xcsolny@fch.vutbr.cz

Nano-sized iron oxide particles such as maghemite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, hematite $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ and magnetite Fe_3O_4 are well known for their multiple applications such as; medicine, catalysis, sensors, memory devices and electronics. In photocatalytic properties, these particles play important role as holder for photocatalytic compounds, such as co-doped TiO₂. In order to maintain high surface area of such photocatalytic compounds and to get easy and economic process of restoring photocatalysts from the cleaning system utilizing their magnetic behaviour, these particles are used for also preparing core-shell catalysts. In present study, the nanosized iron oxide particles are synthetized by precipitation of Mohr's salt $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ with sodium hydroxide solution and later in the process they are coated with nanosized TiO₂. XRD, SEM and pH measurements are used in this study.

Keywords: nanosized Iron oxide particles, TiO₂, core-shell catalyst, Mohr's salt.

The author didn't submit the contribution before the proceedings deadline.

The issue of application Ionic Liquids for the precipitation of Mordant Blue 9 from model waste water

Miroslav Šimek

Tomáš Weidlich

University of Pardubice

Faculty of chemical technology

Institute of environmental and chemical engineering

Studentská 95, 532 10 Pardubice, Czech Republic

miroslav.simek@upce.cz

1 Introduction

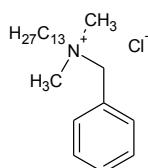
The chlorinated acid textile dye Mordant Blue 9 (MB9) is widely used colorant with worldwide annual production of hundreds of tons. Mordant Blue 9 is used for dyeing wool, silk or nylon [1]. This azo dye is produced by diazotization of 3-amino-5-chloro-2-hydroxybenzene-sulfonic acid dissolved in aqueous solution using sodium nitrite and mineral acid at 0–5 °C [2]. The produced diazonium salt is coupled with 5-hydroxynaphthalene-1-sulfonic acid in the next reaction step [3]. The produced MB9 dye is water soluble and it is isolated from the violet aqueous solution by salting out process (addition of excess of NaCl).

The water solubility of azo dye is caused by the binding of SO₃H as water solubilizing group into the structure of manufactured dye. However, high water solubility of dyes, which is essential for simple dyeing of textile fibres, causes the main environmental problem associated with production and utilization of dyes. The produced waste waters are highly contaminated with residues of dissolved dyes, which causes dark color and low biodegradation of these waste waters. Limited biodegradation of impurities dissolved in waste water is characterized by ratio of BOD versus COD (Biological Oxygen Demand versus Chemical Oxygen Demand). In addition, the production of halogenated dyes like Mordant Blue 9 is associated with increased parameter value of AOX (Adsorbable Organic Halides).

1.1 Application of Ionic Liquids

Modern method for precipitation of textile dye containing solubilizing group $-SO_3H$ or $-COOH$ from waste water, is used ionic liquids – ILs [4] with coagulant (Al^{3+} , Fe^{3+} salts). This procedure is described in the patent University of Pardubice CZ 20120359 [5].

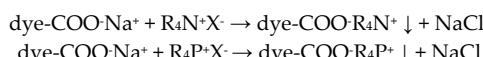
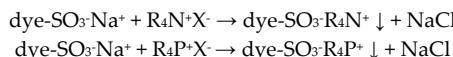
Suitable ionic liquids for dye removal from waste water are a quaternary ammonium ($R_4N^+X^-$) or phosphonium salts ($R_4P^+X^-$). For precipitation of Mordant Blue 9 from model waste waters used a combination of Benzalkonium chloride (BAC, Fig.1.), it is cheap and commercially available ionic liquids and ferric sulphate (coagulant).



354.012

Fig. 1: Structure of Benzalkonium chloride (BAC)

When precipitation of the dye solution is ion exchange applications of liquid ion exchanger to form an ion pair. Generally, precipitation described by the equations:



Precipitating the ionic liquid leads to formation of an ion pair which is insoluble in water. This ion pair is very soluble in an organic solvent (ethanol, ...). The obtaining precipitate (ion pair) has a much higher molecular weight than the starting compounds. This ion pair can be removed by sedimentation and subsequent filtration.

Patent CZ 20120359 enabling removal of dyes containing the group $-SO_3H$ from the aqueous solution, was tested in a model of waste water purification with a dye Mordant Blue 9 (Fig. 2).

In model waste water was monitored parameters AOX, COD, biological oxygen demand (BOD) and total color of waste water before and after the application of ionic liquids in combination with a coagulant.

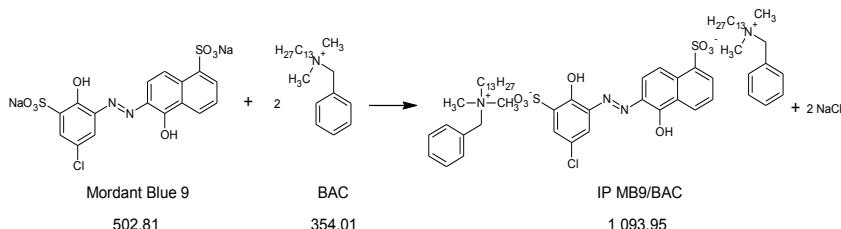


Fig. 2: Process of precipitation of Mordant Blue 9 with Benzalkonium chloride (BAC)

Experiments have demonstrated the effective application of ionic liquids in combination with a coagulant for removal of Mordant Blue 9 dye from an aqueous solution.

Very important factors for precipitation of textile dyes from waste water are molar ratio ILs:colorant and the pH during precipitation.

Dye Mordant Blue 9 contains in its structure two groups $-\text{SO}_3\text{H}$, which occurs when precipitation ILs cleavage hydrogen, forming an ionic bond with the molecule with molecule of ionic liquids.

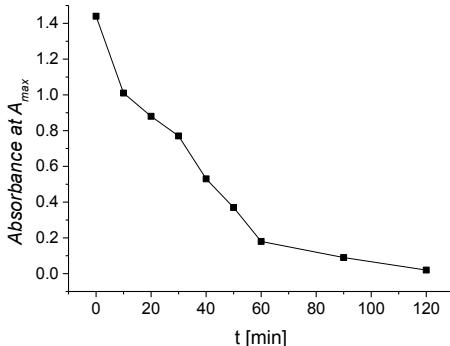
2 Experimental

Table 1 describes using various molar ratio (ILs:colorant) when using ionic liquids. The optimal molar ratio (MB9:BAC) is 1:1. This means that one mole of $-\text{SO}_3\text{H}$ group corresponds to one mole of ionic liquids. With an excess of ionic liquid in the solution during the precipitation leads to effective formation of an ion pair, but the unreacted part of the ionic liquids remained in solution, which is not economically acceptable.

Table 1: Effect of molar ratio on the efficiency of precipitation Mordant Blue 9

Molar ratio MB9:BAC	Initial c MB9 [μmol]	Mass concentration BAC [μmol]	Initial absorbance (516 nm)	Final absorbance (516 nm)	Effectiveness of precipitation [%]
1:0.5		50		1.174	18.98
1:1	100	100	1.443	0.028	98.05
1:1.5		200		0.025	98.1
1:2		400		0.049	96.78

Graph 1 shows the kinetics during precipitation of Mordant Blue 9 from model waste water. The optimal time the precipitation of dye is 120 min.



Graph 1: Kinetics of the precipitation process

During precipitation was reduce parameter AOX of more than 99 %, as well reducing the total coloring of waste water by more than 99 %, when solution after precipitation ILs almos clear (Table 2).

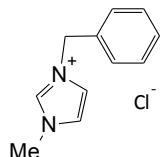
Table 2: Results of precipitation Mordant Blue 9 from aquenous solution

Intial c MB9 [μmol]	Mass concentration BAC [μmol]	Intial absorbance (516 nm)	Final absorbance (516 nm)	Intial AOX [$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$]	Final AOX [$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$]
100	200	1.443	0.011	3.315	0.014

It was confirmed that used of benzalkonium chloride, which contains a nitrogen bonded to the aliphatic chain (C13), can be effectively synthesized of ion pair. Significant effect on the precipitation has a volume of the whole molecule.

In other hand, for the precipitation of the dye Mordant Blue 9 from an aqueous solution, was used other type of ionic liqids, namely 1-benzyl-3-methylimidazolium chloride (BzmimCl, Fig.3), which doesn't contains long aliphatic chain, but benzyl.

The total volume of the molecule and molecular weight BzmimCl are compared to the Benzalkonium chloride significantly smaller.



208.68

Fig. 3: Structure of 1-benzyl-3-methylimidazolium chloride

Applacation the BzmimCl by precipitation of dye Mordant Blue 9 from model waste water was not succesfull. Very important for precipitation is polarity of the ionic liquids. The removal efficiency of Mordant Blue 9 with BzmimCl was only 4 %.

Table 3: Results of precipitation Mordant Blue 9 from aquenous solution with BzmimCl

Initial ζ MB9 [μmol]	Mass concentration BzmimCl [μmol]	Initial absorbance (516 nm)	Final absorbance (516 nm)	Effectiveness of precipitation [%]
150	300	2.109	2.027	3.88

The performed experiments was therefore not confirmed the possibility of application of the ionic liquid 1-benzyl-3-methylimidazolium chloride for precipitating dye Mordant Blue 9 from model waste water.

The patent CZ 20120359 was also successfull tested for precipitation of dye Chrysofenin from model waste water.

3 Conclusion

A suitable procedure for optimizing the application of the ionic liquids in combination with a coagulant (Patent CZ20120359) can effectively compete with methods of removing organic pollutants from waste water such as Fenton's oxidation agent or sorption on charcoal. Use of ionic liquids are promising method for the future that you will certainly find a place among the traditional methods of chemical treatment of wastewater.

Ionic liquids does not be used only for the purification of water, but also for the synthesis of pure ionic pairs with selected compounds (e.g. colorants) for which actively seeking employment.

4 Literature

1. World dye variety, Mordant Blue 9, [Online]. [cit. 2015-11-10], Available from <http://www.worlddyeveriety.com/mordant-dyes/mordant-blue-9.html>
2. Carliell, C. M. – Barclay, S. J. – Naidoo, N. – Buckley, C. A. – Mulholland, D. A. – Senior, M. Microbial decolorization of a reactive azo dye under anaerobic conditions. *Water SA*, 21, 61. 1995.
3. Meindersma G. – Maase M. - De Haan A. – Ullmann's Encyklopedia og Industrial Chemistry: *Azo dyes*, 2007, p.2 498–2 510.
4. Meindersma G. – Maase M. – De Haan A. – Ullmann's Encyklopedia og Industrial Chemistry: *Ionic Liquids*, 2007, p.13076.
5. Martinková J. – Weidlich T. – Dye precipitation process from aqueous solutions; *Patent, CZ20120359*, 2013.

Characterization of Boron-Doped Diamond Electrodes Prepared under the Different Conditions

Michaela Štěpánková

Renáta Šelešovská, Lenka Janíková, Kateřina Nováková, Jaromíra Chýlková,
Marian Vojs

*University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Institute of Environmental and
Chemical Engineering
Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic
st26846@student.upce.cz*

1 Introduction

Boron doped diamond electrodes (BDDes) were introduced for electroanalytical chemistry in the early nineties of the twentieth century¹⁻². The pure diamond is distinguished by outstanding mechanical and chemical stability and it is one of the best natural insulators. For its electrochemical utilization, it needs to be doped with atoms of other elements, most often with boron³. It is known to be a remarkable material due to its particularly attractive properties combining chemical resistance, optical transparency, thermal conductivity, high thermal stability and stable background current. The wide potential window about 3 V is the greatest advantage⁴⁻⁵. The common BDD films used in electroanalysis usually grow on Si supports from dilute mixtures of a hydrocarbon gas (typically methane) in hydrogen using one of several energy-assisted chemical vapor deposition methods (CVD). For boron doping process, diborane or trimethylboron are added into the mixture³. Working surface of these electrodes has a paraffinic character, so low adsorption on the surface is observed during electroanalytical measurements; the problems with passivation are minimized^{3, 6-7}. This electrode material has already been utilized as a sensitive analytical tool in determination inter alia of various pesticides, e.g. methidation⁸, carbaryl⁹ or picloram¹⁰. Therefore, the electrochemical properties of BDD films prepared in laboratory using heated filaments chemical vapor deposition (HF CVD) under the different conditions (various ratio of CH₄/H₂ and B/C) and their applicability for the determination of herbicide linuron (LIN) were studied in present paper.

Linuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylurea (IUPAC), CAS: 330-55-2) is a substituted urea herbicide used to control newly emerging and germinating grasses and broad-leaved weeds. It is labelled for field and storehouse usage in such crops as soybean, cotton, corn, bean, potato, carrot, winter wheat, asparagus, and fruit crops. It may be applied pre-plant, pre-emergence, post-emergence, or post-transplant using ground equipment. LIN acts as an herbicide through the inhibition of photosynthesis. It is a

slightly toxic compound and belongs in EPA toxicity class III¹¹⁻¹³. The electrochemical determination of LIN using various types of working electrodes have been described¹⁴⁻¹⁶.

2 Experimental

2.1 Reagents and materials

All chemicals used for preparation of the standard solutions, supporting electrolytes and other stock solutions were of p.a. purity. The electrolytes based on 1 M, 0.5 M and 0.1 M HNO₃ were diluted from 65 % HNO₃ (Penta, Praha, Czech Republic). Britton-Robinson (B-R) buffer (pH 2-12) was made from an acidic component consisting of 0.04 M CH₃COOH, 0.04 M H₃BO₃ and 0.04 M H₃PO₄ and an alkaline component of 0.2 M NaOH (all Lachema, Brno, Czech Republic). Stock solutions of 0.1 M KCl and K₄[Fe(CN)₆] (both from Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) were prepared by dissolution of the appropriate amounts of solid substances in distilled water. 1 × 10⁻³ M stock solution of LIN was prepared by dissolution of the LIN powder (purity 99.7 %, Sigma Aldrich, Praha, Czech Republic) in 70 % acetonitrile and stored in a refrigerator in the glass flask. All solutions were prepared in distilled water.

2.2 Instrumentation

Voltammetric measurements were performed by computer controlled Eco-Tribo Polarograph (Polaro-Sensors, Prague, Czech Republic) equipped by POLAR.PRO software (version 5.1) for Windows. All measurements were provided in a 3-electrodes set up, where commercially purchased BDDE (7.07 mm²) with B/C ratio 1 000 ppm (declared by producer Windsor Scientific, United Kingdom) and BDDEs (0.43 mm²) with B/C ratio 0, 1 000, 2 000, 4 000, 8 000, 10 000, 15 000, and 20 000 ppm and CH₄/H₂ ratio 0.5, 1, and 2 % (Slovak University of Technology in Bratislava, Slovak Republic) served as the working electrodes, saturated silver/silver chloride (Ag/AgCl) as a reference and platinum wire as an auxiliary electrode (both Monokrystaly, Turnov, Czech Republic). Electrochemical impedance spectroscopic (EIS) measurements were performed with potentiostat PGSTAT302N + FRA2 module controlled by NOVA 1.10 software (Metrohm Autolab, The Netherlands). All measurements were performed at laboratory temperature (23±2 °C).

Raman spectra were measured at room temperature using ISA Dilor-Jobin Yvon-Spek LabRAM confocal system with 632.8 nm He-Ne laser. Scanning electron microscopy (SEM) was carried out using JEOL JSM-7500F scanning electron microscope. The values of pH were measured using pH-meter Hanna 221 (Hanna Instruments, USA).

2.3 Fabrication of BDDEs

The n-type Si(100) wafer with 2 µm thick SiO₂ layer (CVD, Oxford PlasmaLab 80) was used as a substrate for fabrication of BDD sensors. Firstly, the substrates were cleaned with isopropanol and deionized water and subsequently seeded in the ultrasonic bath using a nanodiamond powder < 10 nm (CAS No. 7782-40-3, Sigma Aldrich). The BDD films were deposited for 4 hours using double bias enhanced hot filaments reactor (HF CVD). A boron-doped nanocrystalline diamond was achieved by adding trimethylboron

(TMB) to the 0.5 %, 1 %, and 2 % CH₄ in H₂ gas mixture. The B/C ratio in the gas phase changed in the range from 0 to 20 000 ppm. The deposition pressure was 3 000 Pa and temperature 650±20 °C. The active area (0.43 mm²) of working electrode was created in 400 nm thick SiO₂ layer (CVD, Oxford PlasmaLab 80) using standard optical lithography and wet etching in BOE solution (6:1 volume ratio of 40 % NH₄F in water to 49 % HF in water). The electrode chip was electrically connected by Ag polymer paste (CB115, DuPont) to the printed circuit board's support and completely passivated by non-conducting paste (548X, DuPont) and dried at 180 °C for 30 min in air.

2.4 Electrochemical impedance spectroscopic and voltammetric measurements

Each BDDE was pretreated anodically (3 V for 20 s) and cathodically (-3 V for 80 s) at the beginning of each working day in 0.5 M H₂SO₄ (Penta, Praha, Czech Republic).

Cyclic voltammograms of redox system of K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] were recorded at the scan rate (v) 100 mV s⁻¹. The influence of the ratio of B/C and CH₄/H₂, respectively, on voltammetric behavior of LIN was studied using all tested BDD electrodes. Cyclic voltammetry (CV) was measured between potentials from -500 mV to +2 200 mV with v of 100 mV s⁻¹. DC voltammetry (DCV), with followed parameters: initial potential (E_{in}) of -500 mV, final potential (E_{fin}) of +1 900 mV and v of 25–500 mV s⁻¹, was utilized for examination of the effect of scan rate on the voltammetric response of LIN. Differential pulse voltammetry (DPV) was used for the study of the voltammetric behavior of LIN in dependence of pH of supporting electrolyte (E_{in} = -500 mV, E_{fin} = +2 000 mV, v = 100 mV s⁻¹, pulse height +50 mV and pulse width 80 ms). DPV with optimized parameters (E_{in} = +400 mV, E_{fin} = +1 600 mV, v = 50 mV s⁻¹, pulse height +70 mV and pulse width 20 ms) was applied for LIN determination.

The limit of detection (LOD) was calculated as a three times the standard deviation for the blank solution and divided by the slope of the calibration curve. The parameters of calibration curves (e.g., slope, intercept) were calculated using software OriginPro 9 (OriginLab Corporation, USA). Excel 2010 software (Microsoft, 2010) was used for construction of the graphical dependences.

EIS was carried out with the frequency range from 0.1 Hz to 100 kHz and with the signal amplitude of 10 mV. The different potentials were applied on each electrode during measurement. The appropriate potential was determined from the obtained CV curves.

3 Results and discussion

3.1 Surface characterization of BDDEs

Newly prepared BDD films were examined for morphology by SEM. It was found that the thickness (extracted from the SEM images) of created BDD film increases with the increasing CH₄/H₂ ratio. Furthermore, the Figure 1 demonstrates the increasing of the grain size with the increasing of CH₄/H₂ ratio from 0.5 to 2 %. The similar results were observed for all tested boron doping levels. The grain size was influenced also by the ratio of B/C, but the enlarging of the grains with the boron concentration was not so evident.

The Raman spectra measured at the wavelength of 632 nm for BDD films prepared in the mixture of 1 % CH₄ in H₂ for individual B/C ratios are presented in Figure 2. It

shows bands characteristic for boron doped diamond. One sharp peak at $1\ 335\ \text{cm}^{-1}$ due to sp^3 C-C bonds can be observed for the un-doped diamond film (0 ppm). It implies that a high quality diamond was deposited on the silicon substrate. Nevertheless, this signal weakens gradually as the B/C ratio increases. Two broad bands centered at approximately 470 and $1\ 220\ \text{cm}^{-1}$ are associated with the actual boron incorporation in the lattice. The maximum at $470\ \text{cm}^{-1}$ may originate from a pair of boron atoms and shifts with the increase of the boron content to lower wavenumbers. Raman spectra exhibit also significant maximum around $1\ 580\ \text{cm}^{-1}$ corresponding to the sp^2 graphitic carbon bonds, which indicate the presence of graphite like impurities at grain boundaries. The bands placed around 520 and $960\ \text{cm}^{-1}$ are associated with first and second order of Si. Raman measurements with similar results were realized also for CH_4/H_2 ratio of 0.5 and $2\ \%$.

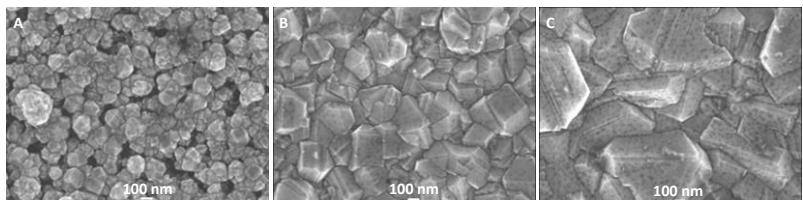


Figure 1: SEM images of BDD films prepared in the presence of 0.5 (A), 1 (B), and 2 (C) % of CH_4 in H_2 gas mixture with the boron content of $2000\ \text{ppm}$.

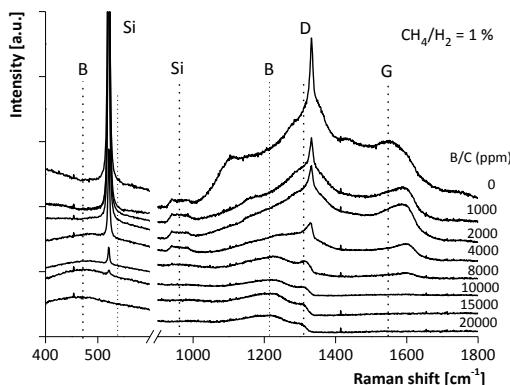


Figure 2: Raman spectra of BDD films prepared in the presence of $1\ \%\text{CH}_4$ in H_2 gas mixture with the boron content from 0 to $20\ 000\ \text{ppm}$.

3.2 Electrochemical characterization of BDDEs

Cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) of the redox system $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/^{4-}$ were used for electrochemical characterization of prepared electrodes. The important characteristics of the recorded CV curves are differences

between anodic and cathodic peak potentials (ΔE_p), anodic and cathodic peak heights (I_A , I_C) and the ratios of I_A/I_C . It was found that the peak separation decreases with the increasing of boron doping level, which corresponds to the increasing of reversibility, and the heights of both responses, anodic as well cathodic increase with higher boron concentration in BDD film. The width of the potential window (ΔE_{lim}) was tested in two supporting electrolytes B-R buffer of pH 2 and 0.1 M KCl. It was found that the potential window decreases with the increasing of boron doping level. The analogical trend was observed also for the dependence on content of CH₄. The electrochemical characterization of BDD films prepared in media of 1 % CH₄/H₂ with the range of B/C from 0 to 20 000 ppm was studied in the redox system [Fe(CN)₆]^{3-/4-} in 0.1 M KCl also with utilization of EIS. The EIS data corresponded very well with the above mentioned results of cyclic voltammetry. It was found that the impedance decreases with the increasing of boron doping level (Figure 3); it means the electron transfer is much more significant with the increasing of B/C ratio. The decrease of impedance of the analyzed electrochemical system corresponds to the decrease in resistivity of the BDDE with the increase of boron doping level.

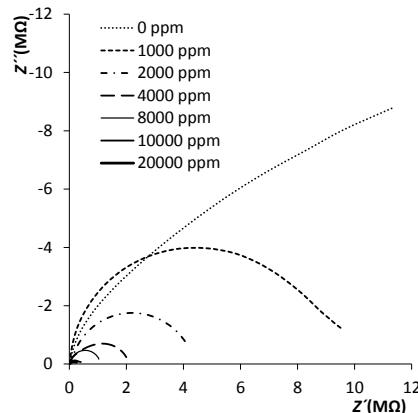


Figure 3: Electrochemical impedance spectrograms for 2.5 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} in 0.1 M KCl recorded on BDDEs prepared in media of 1 % CH₄/H₂ with the range of B/C from 0 to 20 000 ppm.

3.3 The influence of BDD composition on voltammetric determination of LIN

Finally, all BDDEs in combination with DPV were tested for LIN determination under the optimized experimental conditions. The voltammetric behavior of LIN and optimization of analytical method has been carried out with commercially available BDDE. Using CV it was found that LIN provides one irreversible oxidation peak at about +1 300 mV in wide range of pH. No reduction signal was recorded under the used working conditions (Figure 4B) and the electrode process could be described as chemically irreversible. B-R buffer of pH 2 served as a supporting electrolyte because the highest oxidation response was observed in this medium. The linear dependence of peak height

on the square root of scan rate was measured using DCV, which corresponds to the diffusion-controlled electrode process. The parameters of DPV were optimized (summarized in experimental part) using BDDE for LIN determination. The following statistical parameters of the proposed method were obtained. The values of RSD of 5 times repeated determinations for various concentration levels of LIN (1.00×10^{-5} , 5.00×10^{-6} , and 2.50×10^{-6} M) were calculated and the results ($RSD < 2\%$) proved very good repeatability of applied method. The linear dynamic range (LDR) was found from 5×10^{-7} to 1.2×10^{-4} M and the value of LOD was 1.41×10^{-7} M. The example of the concentration dependence of LIN measured on commercial BDDE using DPV is shown in Figure 4A.

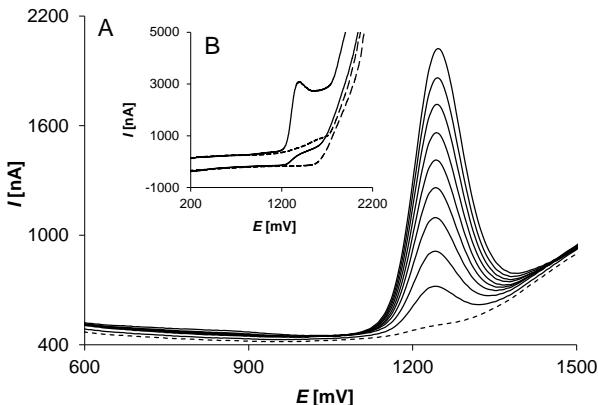


Figure 4: The concentration dependence of LIN (DPV, $c_{LIN} = 5.0 \times 10^{-6}$ - 4.5×10^{-5} M) (A) and the cyclic voltammogram ($c_{LIN} = 1.0 \times 10^{-4}$ M) (B) obtained on BDDE.

Cyclic and DP voltammograms, respectively, of 5×10^{-5} mol dm⁻³ (CV) and 1×10^{-5} mol dm⁻³ (DPV) LIN were recorded using all investigated laboratory prepared BDDEs and the dependence of peak heights (I_p) on ratio of B/C in gas phase is shown in Figure 5. It is obvious, that the oxidation signal increases with the increasing of B/C ratio, but this trend is not too clear. The highest peaks were observed in case of highest content of boron for 0.5, 1 as well as 2 % CH₄/H₂. On the other hand the significant increase in the response of LIN was detected also for BDDEs with the B/C ratio of 4 000 ppm, which can be caused by a shifting to metallic conductivity. Therefore, six selected BDDEs (highlighted points) were in the choice for the following investigation and series of concentration dependences of LIN in different concentration ranges were measured applying DPV with optimized parameters. The obtained statistical parameters for particular electrodes are summarized in Table I. The achieved values of RSD of 11 repeated measurements do not exceed 3 %, which indicates a very good repeatability. The repeatability of LIN determination was tested at the different concentration levels. Each analysis by standard addition method was 5 times repeated and the values of RSD document very good repeatability ($RSD(5) < 2\%$) of LIN determination using all investigated BDDEs. Generally, it can be conclude that BDDEs with higher boron doping level yielded lower values of LOD, which is caused by higher conductivity of the electrode material. The lowest LOD (8.81×10^{-9} mol dm⁻³) was achieved with 4 000 ppm (2 % CH₄/H₂)

electrode. A low value is probably given by very good linearity of recorded concentration dependence with correlation coefficient closely approach to one.

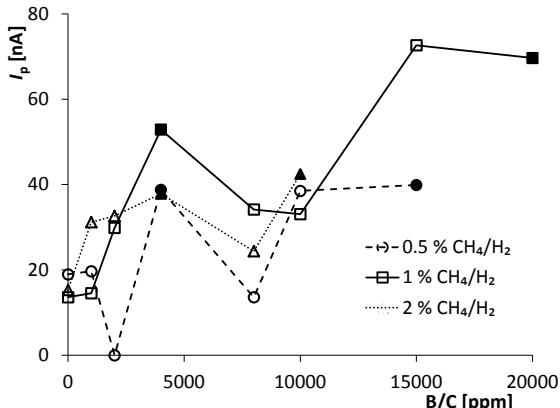


Figure 5: The dependence between peak heights and boron-doping level for the BDDEs.

Table 1: Statistical parameters of LIN voltammetric determination obtained on BDDEs

CH ₄ /H ₂ [%]	B/C [ppm]	LDR [M]	RSD _M (11) [%]	RSD _D (5) [%]	LOD [M]
0.5 %	4 000	$5 \times 10^{-7} - 8 \times 10^{-5}$	1.21	<1.3	1.50×10^{-7}
	15 000	$2.5 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-4}$	1.08	<5.4	5.33×10^{-8}
1 %	4 000	$5 \times 10^{-7} - 1.2 \times 10^{-4}$	2.67	<0.9	1.15×10^{-7}
	20 000	$5 \times 10^{-7} - 1.6 \times 10^{-4}$	0.15	<0.9	7.91×10^{-8}
2 %	4 000	$1 \times 10^{-7} - 1.6 \times 10^{-4}$	0.41	<0.4	8.81×10^{-9}
	10 000	$2.5 \times 10^{-7} - 1.6 \times 10^{-4}$	1.17	<0.6	2.88×10^{-8}

4 Conclusion

Physical, chemical and electrochemical properties of boron-doped diamond electrodes prepared by CVD with heated filaments in dependence on the boron doping level and on the content of CH₄ in mixture with H₂ during BDD films deposition have been investigated in present paper. Scanning electron microscopy and Raman spectroscopy were used for surface characterization of BDD films. Cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy were performed to characterize BDDEs in the presence of Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ as a redox probe. Optimized parameters of DPV were used for determination of herbicide LIN on BDDEs and it can be concluded, that laboratory prepared BDDEs can be very sensitive and it is very important to optimize the procedure of their preparing for the obtaining of the best electrochemical properties. The content of boron during the film deposition exhibits greater importance than the content of CH₄ in the gas mixture. Improved electrochemical characteristics were observed for electrodes with a higher content of boron prepared in medium of higher CH₄/H₂ ratio.

5 References

1. PATEL, K. – HASHIMOTO, K. – FUJISHIMA, A., Application of boron-doped CVD-diamond film to photoelectrode. *Denki Kagaku*, 1992, vol. 60, no. 7, s. 659–667.
2. SWAIN, G.M. – RAMESHAM, R. The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline thin-film electrodes. *Analytical Chemistry*, 1993, vol. 65, no. 4, s. 345–351.
3. PECKOVÁ, K. – MUSILOVÁ, J. – BAREK, J. Boron-doped diamond film electrodes – New tool for voltammetric determination of organic substances. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2009, vol. 39, no. 3, s. 148–172.
4. MUSILOVÁ, J. – BAREK, J. – PECKOVÁ, K. The use of boron-doped diamond film electrodes for detection of organic compounds. *Chemicke Listy*, 2009, vol. 103, no. 6, s. 469–478.
5. ASHCHEULOV, P. – ŠEBERA, J. – KOVALENKO, A. – PETRÁK, V. – FENDRYCH, F. – NESLÁDEK, M. – TAYLOR, A. – VLČKOVÁ ŽIVCOVÁ, Z. – FRANK, O. – KAVAN, L. – DRAČÍNSKÝ, M. – HUBÍK, P. – VACÍK, J. – KRAUS, I. – KRATOCHVÍLOVÁ, I. Conductivity of boron-doped polycrystalline diamond films: influence of specific boron defects. *The European Physical Journal B*, 2013, vol. 86, s. 443.
6. BAREK, J. – FISCHER, J. – NAVRÁTIL, T. – PECKOVÁ, K. – YOSYPCHUK, B. – ZIMA, J. Non-traditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds. *Electroanalysis*, 2007, vol. 19, no. 19-20, s. 2003–2014.
7. PECKOVÁ, K. – BAREK, J. Boron doped diamond microelectrodes and microelectrode arrays in organic electrochemistry. *Current Organic Chemistry*, 2011, vol. 15, no. 17, s. 3014–3028.
8. HACHAMI, F. – ERRAMI, M. – BAZZI, Lh. – SALGHI, R. – HILALII, M. – BAZZI, L. Anodic oxidation of Methidation at boron-doped diamond electrode and degradation mechanism. *Journal of Materials and Environmental Science*, 2014, vol. 5, no. 5, s. 1516–1523.
9. CODOGNOTO, L. – TANIMOTO, S. T. – PEDROSA, V. A. – SUFFREDINI, H. B. – MACHADO, S. A. S. – AVACA, L. A. Electroanalytical determination of carbaryl in natural waters on boron doped diamond electrode. *Electroanalysis*, 2006, vol. 18, no. 3, s. 253–258.
10. BANDŽUCHOVÁ, L. – ŠELEŠOVSKÁ, R. – ŠVORC, L. – CHÝLKOVÁ, J. Collection of Conference Proceedings International Conference: *Modern Electrochemical Methods XXXIV*, Jetřichovice, May 19th–May 23rd, 2014, Book of Abstracts (Navrátil T., Fojta M. and Pecková K., ed.), s. 9.
11. EPA: Pesticide registration, [online], 1995 [cited 2015-11-16]. Available from URL <http://envirocancer.cornell.edu/turf/pdf/linuron_fs.pdf>.
12. PATTERSON, M. Linuron: Analysis of risks to endangered and threatened salmon and steelhead, [online], 2004 [cited 2015-11-16]. Available from URL <<http://www.epa.gov/oppfead1/endanger/litstatus/effects/linuron-analy.pdf>>
13. Extoxnet. Extention toxicology network, Pesticide information profiles, Linuron. [online], 1996 [cited 2015-11-16]. Available from URL <<http://extoxnet.orst.edu/pips/linuron.htm>>.

14. LIMA, F. – GOZZI, F. – FIORUCCI, A.R. – CARDOSO, C.A.L. – ARRUDA, G.J. – FERREIRA, V.S. Determination of linuron in water and vegetable samples using stripping voltammetry with a carbon paste electrode. *Talanta*, 2010, vol. 83, no. 5, s. 1763–1768.
15. ĐORĐEVIC', J. – PAPP, Z. – GUZSVANY, V. – ŠVANCARA, I. – TRTIC' - PETROVIC', T. – PURENOVIC', M. – VYTRAS, K. Voltammetric determination of the herbicide linuron using a tricresyl phosphate-based carbon paste electrode. *Sensors*, 2012, vol. 12, no. 1, s. 148–161.
16. FIGUEIREDO-FILHO, L.C.S. – SARTORI, E.R. – FATIBELLO-FILHO, O. Electroanalytical determination of the linuron herbicide using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode: comparison with a boron-doped diamond electrode modified with platinum nanoparticles. *Analytical Methods*, 2015, vol. 7, s. 643–649.

This work was supported by the University of Pardubice (project No. SGSFChT_2015006).

Novel Oxy cellulose/Gelatin Nanofibers for Medical Applications

Veronika Švachová
Lucy Vojtová, David Pavliňák, Zdeňka Fohlerová

*Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Materials Chemistry
Purkyňova 464/118, 612 00, Brno, Czech Republic
xcsvachova@fch.vutbr.cz*

Novel hydrolytically stable gelatin nanofibers were modified with sodium or calcium salts of oxidized cellulose (oxy cellulose) to enhance nanofibers' stability and bactericidal efficiency. The unique inhibitory effect of the electrospun gelatin/oxy cellulose nanofibers against pathogenic bacteria was examined by luminometric method using modified bioluminescence of *E. coli* strain. Non-woven nanofiber fabric has been tested for its biocompatibility using human lung adenocarcinoma cells line NCI-H441. Cells cultured on nanofibrous materials firmly adhered to their surface without the changing in shape, as determined by scanning electron microscopy, and did not show any signs of dying as revealed by live/death staining via fluorescence microscope. This newly developed nanofibrous material seeded with NCI-H441 cell line could be therefore used as a platform for lung disease modeling and anti-cancer drug testing. Moreover, novel bactericidal and hemostatic nanofibers, non-toxic to eukaryotic cells represent a promising option for application in surgery and regenerative medicine, particularly in soft tissue engineering.

Keywords: nanofibers, biomedical application, gelatin, oxidized cellulose

Acknowledgement: This research has been supported by the project "CEITEC – Central European Institute of Technology" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from European Regional Development Fund. The paper was supported in part by the project CZ.1.05/2.1.00/03.0086 funded by European Regional Development Fund and project LO1411 (NPU I) funded by Ministry of Education Youth and Sports of Czech Republic.

The author didn't submit the contribution before the proceedings deadline.

Preparation of Silver Nanoparticles by Reduction Using Quercetin and Testing of Their SERS-Activity

Marie Svecova¹

Marcela Dendisova², Pavel Matejka²

University of Chemistry and Technology, Faculty of Chemical Engineering,

Department of Analytical Chemistry¹, Department of Physical Chemistry²

Technicka 5, Praha 6 – Dejvice 166 28, Czech Republic

svecovam@vscht.cz

1 Introduction

Nowadays, nanoparticle (NPs) systems have many applications, e. g. in medicine (drugs transport, antibacterial bandages and creams, sterile clothes in hospital), in industry (filters for water purification, self-cleaning paints) or in analytical chemistry (enhancing substrate for vibrational spectroscopy)¹⁻³.

NPs preparation is very variable, from conventional hydro and solvothermal approaches (preparation temperature at the solvent's boiling point) through colloidal techniques based on reduction of inorganic salt, sol-gel techniques and laser ablation to ultrasound and microwave radiation which have benefits in energy saving and shortening of the reaction time. NPs preparations at lower temperatures are also tested. These parameters, reactants concentrations and pH value influence the final size and shape of NPs. Strong emphasis is also placed on the non-toxicity of the reactants. Therefore, for the synthesis bacteria, actinomycetes, fungi, yeasts, algae and plant extracts have been recently used. Plant extracts contain flavonoids and terpenoids with antioxidant properties which may be used to reduce metal NPs from inorganic salts and extracts also contain carbohydrates and proteins that stabilize the resulting NPs¹⁻⁴.

The most frequently extracted plant parts include leaves or needles, in the case of small plant their entire bodies. Often roots, rhizomes, tubers and seeds^{5, 6} as well as petals are extracted⁷. Bark and gum from the trees⁸ are also used. For its high content of terpenoids, herbs, spices^{9, 10} and essential oils¹¹ are suitable for the reduction of the inorganic salts. Fruit can be processed by two ways – using direct extract or exploit juice^{4, 12}. These extracts and juices are very complex mixture of reducing and stabilization agents. Their concentrations are not strictly defined and this leads to poor reproducibility of the NPs sizes and shapes. Therefore, there appear green syntheses based on pure biologically active or pharmaceutically important substances^{13, 14}.

In this study, biologically active substance quercetin was used for preparation of silver nanoparticles (AgNPs). Quercetin belongs to the flavonoids, plant secondary metabolites, and is widespread in plant material. We believe that using pure quercetin we can easier prepare the AgNPs with the same reproducibility as via conventional syntheses (reduction using trisodium citrate or sodium borohydride) but by more environmental friendly way. Our synthesis is suitable for preparation of enhancing substrate for techniques of surface-enhanced vibrational spectroscopy (SEVS), namely surface-enhanced Raman scattering (SERS) and surface-enhanced infrared absorption (SEIRA). Quercetin and its oxidation product are compounds with relatively low affinity to the enhancing substrate and can be easily removed from enhancing surface before deposition of model analyte for testing of AgNPs SERS-activity.

2 Experimental

AgNPs were prepared using quercetin (structure in Figure 1) as a natural reducing agent. Various ratios of AgNO_3 and quercetin were tested and the AgNPs concentration was increased, because conventional preparations of AgNPs reduced by sodium borohydride or trisodium citrate reach concentration 1×10^{-3} mol l⁻¹. These conventionally prepared AgNPs amplify Raman signal more than our first green synthesized AgNPs reduced by quercetin with reactants ratio $1:1 \times 10^{-4}$ mol l⁻¹. Although the reaction of reduction Ag^+ by quercetin proceeded at laboratory temperature, it was necessary to stabilize AgNPs at higher temperature. Prepared AgNPs were characterized by X-Ray powder diffraction (XRPD), transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS) and absorption UV/Vis spectroscopy. SERS-activity was tested using nicotinic acid and riboflavin, representatives of the B group vitamins.

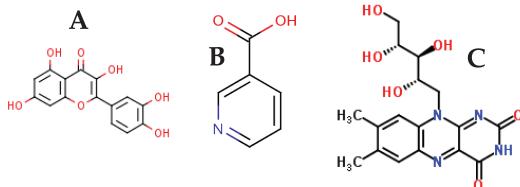
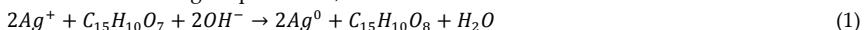


Figure 1: Structure of reducing agent – (A) quercetin – and structures of model analytes for SERS-activity testing – (B) nicotinic acid and (C) riboflavin

2.1 AgNPs preparation

AgNO_3 and quercetin were purchased from Sigma-Aldrich, NaOH was bought from Lach:Ner and used without further purification. All used water was demineralized.

AgNO_3 and quercetin aqueous solutions were mixed in ratios 1:1, 2:1, 4:2 and 4:3 at concentration level 1×10^{-4} mol l⁻¹ (reaction is described by the equation 1)¹⁵. pH value was adjusted at 7.2 by NaOH solution. Selected pH value was based on previous experiments at lower pH values in which the precipitate was produced – possibly silver-quercetin chelate¹⁶ – and at higher pH values, there was silver oxide¹⁷.



Reaction mixtures were heated at 40 °C or 70 °C for AgNPs stabilization for 0–180 min. After 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min and 180 min 5 ml fractions were collected and measured by absorption UV/Vis spectroscopy. Absorption maximum of all measured AgNPs is ca. 405 nm. In figure 2, dependence of peak height on stabilization time for temperatures 40 °C and 70 °C are shown. Stabilization at 40 °C does not significantly affect the peak height – for all stabilization time is almost constant. However, in the case of stabilization at 70 °C peak height grows throughout. With higher concentration of AgNPs in the solution the absorbance grows, of course.

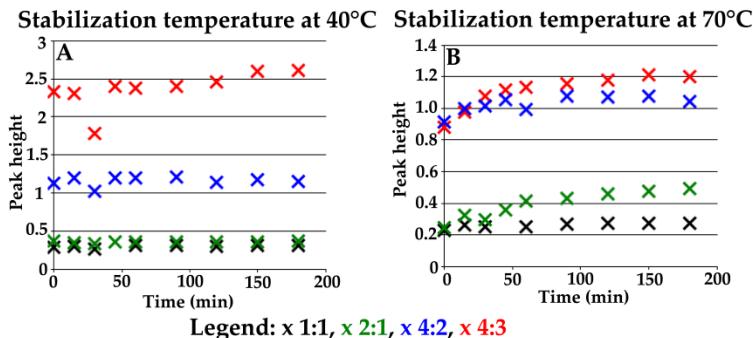


Figure 2: Dependence peak height at stabilization time at temperatures (A) 40 °C and (B) 70 °C

The graphs in Figure 2 show that a longer stabilization time is preferable. But Raman spectra of the system in figure 3 (recorded using dispersive Raman spectrometer AdvantageNIR (DeltaNu, USA) excitation line 785 nm – thermoelectrically cooled diode laser, Peltier cooled CCD detector; power laser was set at the highest, resolution at lowest ($4\text{--}8\text{ cm}^{-1}$), integration time was optimized and always holding a constant for a sample series) show that quercetin and its oxidation product are more deposited on the AgNPs surface by longer heating time – higher intensity of bands, new bands, better spectral information. The resulting AgNPs preparation was chosen compromise 30 min stabilization, because the absorption peak height increases more slowly and only a few molecules of quercetin or its oxidation product are deposited on the AgNPs surface.

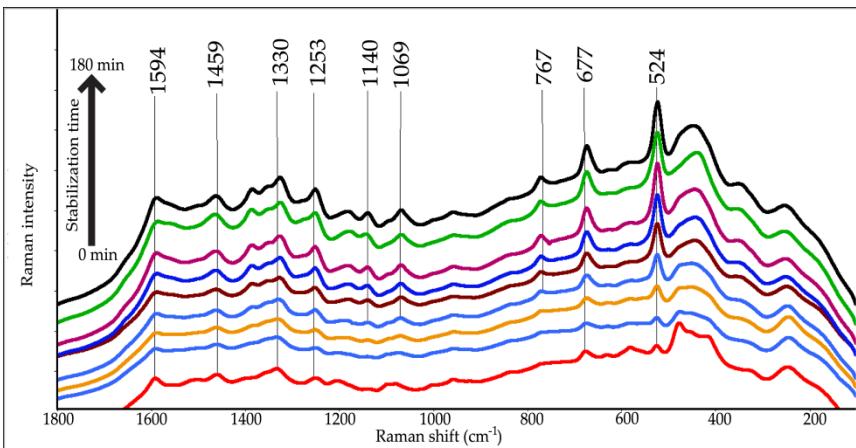


Figure 3: Raman spectra pure AgNPs (ratio of AgNO_3 :quercetin is 4:2, stabilization time 0 – 180 min at 70°C; viewed in offset scale)

The final conditions of this AgNPs preparation are pH value adjusted at 7.2 and stabilization time 30 min at temperature 70 °C.

2.2 Characterization

AgNPs were characterized using XRPD, TEM, DLS and absorption UV/Vis spectroscopy.

- **X-Ray powder diffraction**

Samples were purified by triple centrifugation and redispersion in pure demineralized water. Measurements were carried out in the Laboratory of X-Ray diffractometry and spectrometry Central Laboratories UCT Prague diffractometer X’Pert PRO θ-θ powder diffractometer (PANalytical, Netherlands) in Bragg-Brentano parafocusing geometry using copper K α line radiation ($\lambda=1.5418 \text{ \AA}$, $U=40 \text{ kV}$, $I=30 \text{ mA}$) and ultrafast X’Celerator detector operating at room temperature. Data were analyzed using software X’Pert High Score Plus Version 2.0a.

Diffraction patterns (in figure 4) confirmed the AgNPs formation and eliminate the presence of silver oxide. Peak broadening demonstrates nano size of the particles.

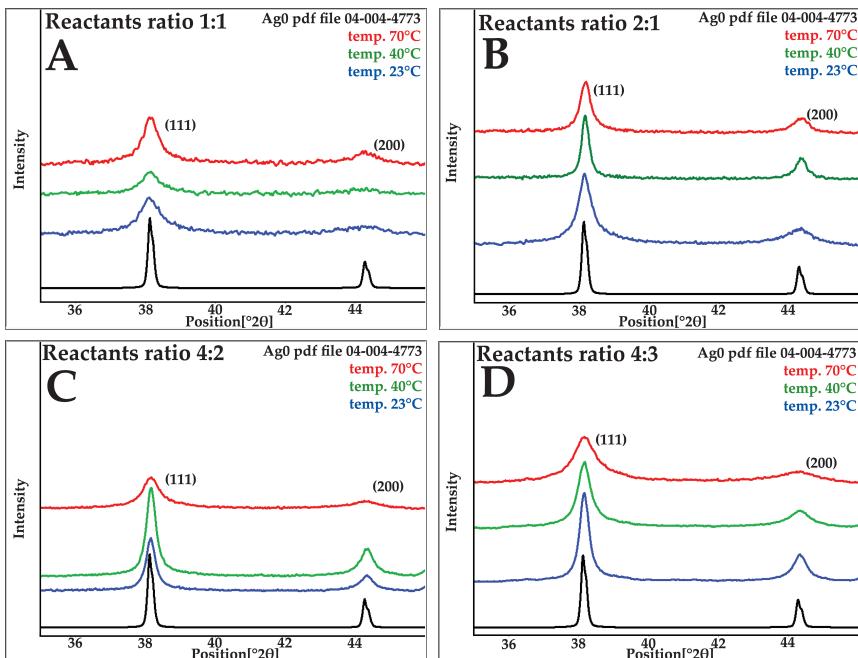


Figure 4: XRPD patterns prepared AgNPs with ratios AgNO₃:quercetin (A) 1:1, (B) 2:1, (C) 4:2, (D) 4:3 at various stabilization temperature (viewed in offset scale)

- **Transmission electron microscopy**

All samples were purified by dialysis and observed by electron microscope JEOL JEM 1010 (JEOL, Japan) with an acceleration voltage 80 kV. Images were taken with a digital camera SIS MegaView II (Soft Imaging System). Data were processed by image analysis software Analysis 2.0.

In Figure 5, TEM images of AgNPs prepared by all combination of reactants ratios and stabilization temperatures are shown. Spherical shape of nanoparticles is observed in all cases and the average size is in the range 16–31 nm (table 1). Moreover, a trend was observed when the AgNPs size decreased using the higher temperature for stabilization.

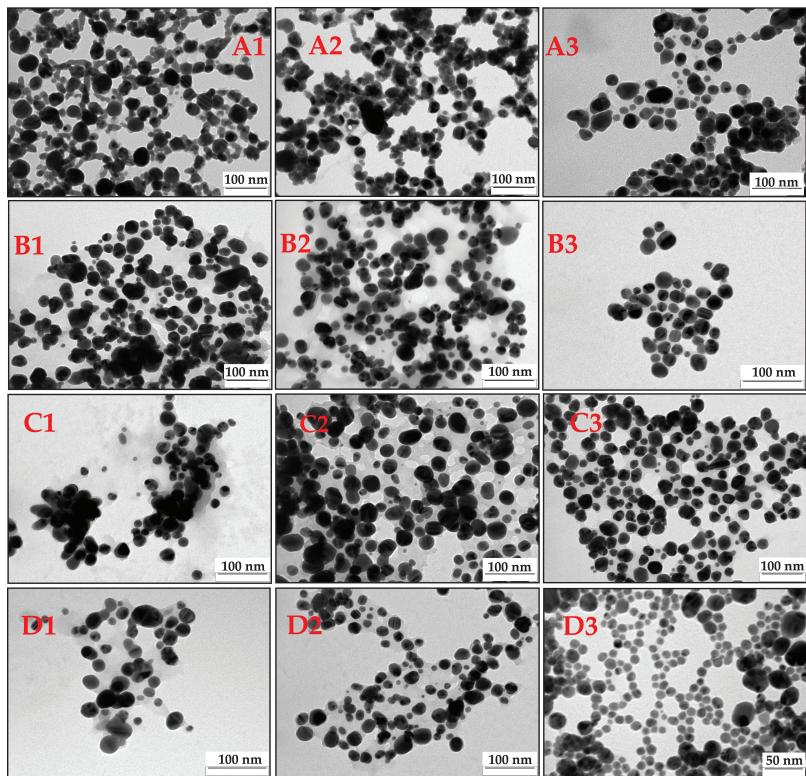


Figure 5: TEM images of AgNPs prepared with ratios AgNO₃:quercetin (A) 1:1, (B) 2:1, (C) 4:2, (D) 4:3 and at temperatures (1) 23°C, (2) 40°C and (3) 70°C

Table 1: Average sizes of AgNPs obtained by TEM images analysis

Ratio AgNO ₃ :Quercetin	1:1	2:1	4:2	4:3
Temperature	Average size [nm]			
23 °C	26	28	31	20
40 °C	24	27	29	16
70 °C	16	20	26	16

- **Dynamic light scattering**

Data were acquired using Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern, UK) at 90° geometry for detection scattered radiation. The sample was injected into a 1-cm cuvette. Measurements were carried out at temperature 25°C after equilibration time 200 s.

In all cases, only one size fraction was obtained and its distributions by numbers are shown in DLS graphs (Figure 7). Positions of maxima are in interval 15–30 nm also obtained by TEM image analysis. Deviations are due to approximations of DLS measurements on round shape of the particles. There was observed a trend of decreasing size of the nanoparticles with increasing stabilization temperature.

DLS graphs of distributions by numbers

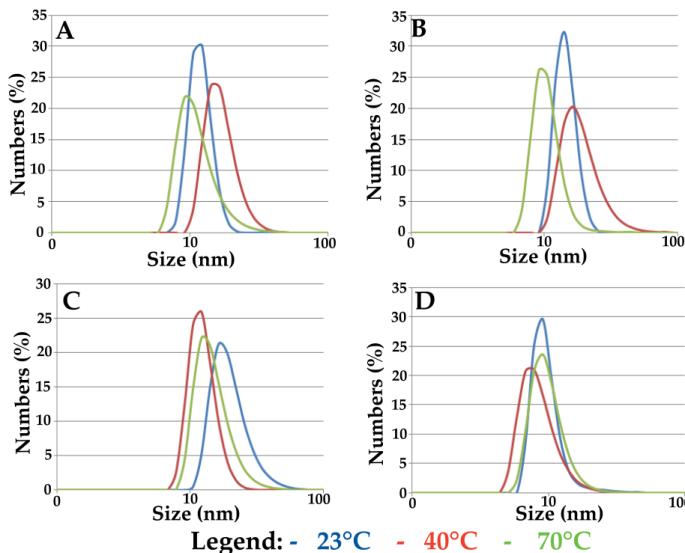


Figure 7: DLS graphs of prepared AgNPs in reactants ratios (A) 1:1, (B) 2:1, (C) 4:2, (D) 4:3 at stabilization temperatures 23 °C, 40 °C and 70 °C

- **Absorption UV/Vis spectroscopy**

Conventional AgNPs characterization was carried out by UV/Vis spectrometer Cintra 404 (GBC, UK) in 5-mm quartz glass cuvette in the wavelength range 800–300 nm with 1-nm resolution.

Absorption maximum position is in the range 400–420 nm. Peak position is closely related to AgNPs size. In these cases, range 400–420 nm corresponds with a particles size 15–30 nm¹⁸. These results confirm the sizes obtained by TEM image analysis.

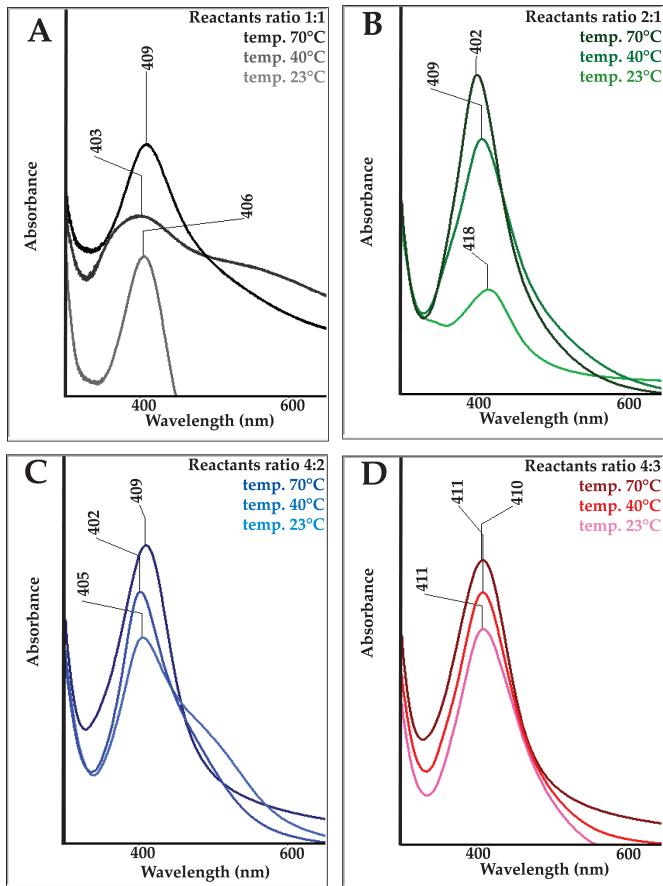


Figure 7: UV/Vis absorption spectra of AgNPs prepared with reactants ratios (A) 1:1, (B) 2:1, (C) 4:2 and (D) 4:3 and stabilized at temperature 23 °C, 40 °C and 70°C (viewed in offset scale)

2.3 Purification, analyte deposition and SERS-activity testing

Quercetin and its oxidation product prevent model analyte to be able to deposit on the enhancing surface of AgNPs. Fortunately, quercetin and its oxidation product are substances with low affinity for the AgNPs surface and can be easily removed from it by two ways: i) centrifugation and redispersion in pure solvent or ii) dialysis. Then model analyte (nicotinic acid and riboflavin) was deposited 24 (no purification and centrifugation) or 48 hours (dialysis). Before SERS measurements system modifications were conducted according to the scheme in Figure 8. These treatments led to improved limit of detection and the overall quality spectral information and better signal/noise ratio.

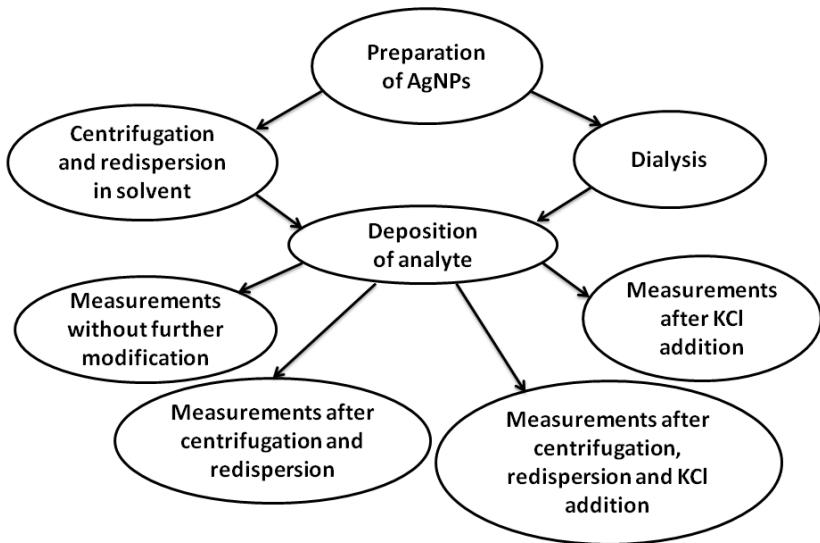


Figure 8: Scheme of treatment from preparation to SERS measurements

SERS-activity was tested using dispersive Raman spectrometer AdvantgeNIR (DeltaNu, USA). All parameters were used in the same setting as the previously discussed (the highest laser power, low resolution, 3 accumulation and integration time 30 s). Concentration range $1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-9}$ mol l⁻¹ was measured. Nicotinic acid, one of B vitamins group, was detected in concentration 1×10^{-3} mol l⁻¹ without purification before analyte deposition and modification after. If AgNPs were purified by dialysis, limit of detection of nicotinic acid had been improved to the concentration 1×10^{-4} mol l⁻¹ (in Figure 9).

Considerable differences between the spectra of pure nicotinic acid and the SERS spectrum on the AgNPs surface are caused by the interaction of the analyte with the metal surface. The form in which the nicotinic acid gets to the AgNPs and its orientation towards this surface will result in attenuation of the band (809 cm⁻¹ in spectrum pure nicotinic acid, 637 cm⁻¹) or shift some peaks (e.g. 1581 cm⁻¹, 389 cm⁻¹). Significantly amplified are bands 1140 cm⁻¹ and 1074 cm⁻¹ (include in-plane vibrations of hydrogen on the pyridine skeleton and deformation vibration of the pyridine) and 1433 cm⁻¹ (in-plane vibration of the pyridine) and 1388 cm⁻¹ (carboxylate anion vibration). Band at 1388 cm⁻¹ demonstrates that the nicotinic acid is oriented to the surface through a deprotonated carboxyl group (its pK_a is 4.8 and the pH value was adjusted during AgNPs preparation to 7.2)¹⁹. Enhancement bands of the in-plane vibrations can also indicate that the nicotinic acid is oriented toward the surface in an upright position.

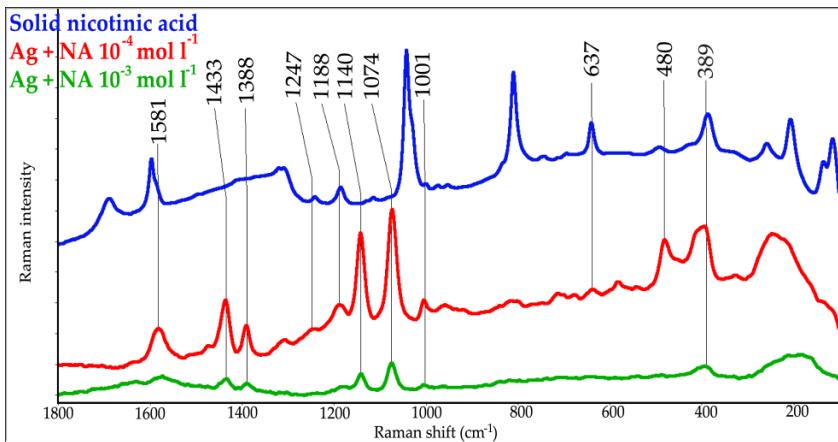


Figure 9: Raman spectrum of pure nicotinic acid and SERS spectra of nicotinic acid on the surface dialyzed AgNPs in concentration 1×10^{-4} and 1×10^{-3} mol l $^{-1}$ (viewed in offset scale)

Next, B₂ vitamin riboflavin was detected on the green-synthesized AgNPs surface in concentration 1×10^{-3} mol l $^{-1}$ only and on the purified AgNPs. Any other modification (without KCl addition) did not improve limit of detection but affected signal/noise ratio and overall quality of the spectral information. In the spectrum (Figure 10) the most intense bands can be assigned to the in-plane deformation vibrations of aromatic and heterocyclic parts of the molecular skeleton (bands 1345 cm^{-1} , 1533 cm^{-1} , 1574 cm^{-1} , 1152 cm^{-1} , 782 cm^{-1}) and bands 1221 cm^{-1} , 1174 cm^{-1} include vibrational motion of CO atoms from hydroxyl groups. Peak at 740 cm^{-1} corresponds to deformation NH vibration in heterocycles and peak at 1399 cm^{-1} to umbrella CH₃ vibration²⁰. Considering the enhanced bands of the in-plane deformation vibrations it can be concluded that riboflavin is oriented toward the surface in an upright position.

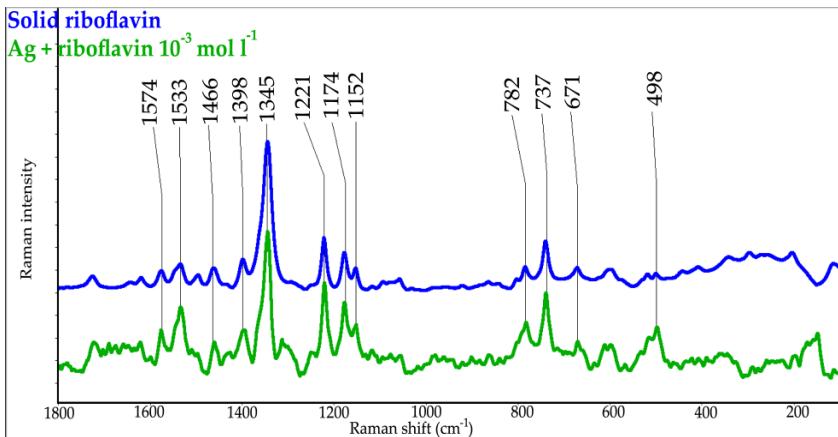


Figure 10: Raman spectrum of pure riboflavin and SERS spectrum of riboflavin on the surface dialyzed AgNPs in concentration 1×10^{-3} mol l $^{-1}$ (viewed in offset scale)

4 Conclusion

In this study, Ag⁺ salt was reduced by quercetin and used for green synthesis of AgNPs. These nanoparticles were characterized by XRPD, TEM, DLS and absorption UV/Vis spectroscopy. AgNPs exhibit spherical shape and their size is in range 15–30 nm depending on the stabilization temperatures and reactants ratios.

Nanoparticles can be generally used as Raman signal amplifiers. Our quercetin reduced AgNPs (reactants ratio 1:1, stabilization temperature 70 °C for 30 min) were tested as enhancing substrate for SERS spectroscopy by nicotinic acid and riboflavin. Limits of the detection for nicotinic acid were 1×10^{-4} mol l⁻¹ and for riboflavin 1×10^{-3} mol l⁻¹. Ratio signal/noise as well as limit of the detection can be improved by purification before deposition of analyte and other modifications after deposition of analyte which were mentioned above.

Future experiments will lead to the maximization of the concentration AgNPs and improved limit of the detection of model analytes.

5 References

1. KHARISOVA, O. V., H. V. R. DIAS, B. I. KHARISOV, B. O. PÉREZ, et al. The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(4), 240–248.
2. NATH, D. AND P. BANERJEE Green nanotechnology – A new hope for medical biology. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2013, 36(3), 997–1014.
3. ROY, N., A. GAUR, A. JAIN, S. BHATTACHARYA, et al. Green synthesis of silver nanoparticles: An approach to overcome toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2013, 36(3), 807–812.
4. HEBBALALU, D., J. LALLEY, M. N. NADAGOUDA AND R. S. VARMA Greener techniques for the synthesis of silver nanoparticles using plant extracts, enzymes, bacteria, biodegradable polymers, and microwaves. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2013, 1(7), 703–712.
5. GEETHALAKSHMI, R. AND D. V. L. SARADA Gold and silver nanoparticles from Trianthema decandra: Synthesis, characterization, and antimicrobial properties. *International Journal of Nanomedicine*, 2012, 7, 5375–5384.
6. LUNA, C., V. H. G. CHÁVEZ, E. D. BARRIGA-CASTRO, N. O. NÚÑEZ, et al. Biosynthesis of silver fine particles and particles decorated with nanoparticles using the extract of *Illicium verum* (star anise) seeds. *Spectrochimica Acta – Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015, 141, 43–50.
7. MANIKANDAN, R., B. MANIKANDAN, T. RAMAN, K. ARUNAGIRINATHAN, et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using ethanolic petals extract of *Rosa indica* and characterization of its antibacterial, anticancer and anti-inflammatory activities. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015, 138, 120–129.
8. MEHMOOD, A., G. MURTAZA, T. M. BHATTI, M. RAFFI, et al. Antibacterial efficacy of silver nanoparticles synthesized by a green method using bark extract of *Melia azedarach* L. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 2014, 9(3), 238–245.

9. REDDY, N. J., D. NAGOOR VALI, M. RANI AND S. S. RANI Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by *Piper longum* fruit. *Materials Science and Engineering C*, 2014, 34(1), 115–122.
10. SOLGI, M. Evaluation of plant-mediated Silver nanoparticles synthesis and its application in postharvest Physiology of cut Flowers. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2014, 20(3), 279–285.
11. VILAS, V., D. PHILIP AND J. MATHEW Catalytically and biologically active silver nanoparticles synthesized using essential oil. *Spectrochimica Acta – Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 132, 743–750.
12. HYLLESTED, J. A., M. E. PALANCO, N. HAGEN, K. B. MOGENSEN, et al. Green preparation and spectroscopic characterization of plasmonic silver nanoparticles using fruits as reducing agents. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2015, 6(1), 293–299.
13. MITTAL, A. K., S. KUMAR AND U. C. BANERJEE Quercetin and gallic acid mediated synthesis of bimetallic (silver and selenium) nanoparticles and their antitumor and antimicrobial potential. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2014, 431, 194–199.
14. ZAIN, N. M., A. G. F. STAPLEY AND G. SHAMA Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 112, 195>202.
15. SOKOLOVÁ, R., Š. RAMEŠOVÁ, I. DEGANO, M. HROMADOVÁ, et al. The oxidation of natural flavonoid quercetin. *Chemical Communications*, 2012, 48(28), 3433–3435.
16. JURASEKOVA, Z., A. TORREGGIANI, M. TAMBA, S. SANCHEZ-CORTES, et al. Raman and surface-enhanced Raman scattering (SERS) investigation of the quercetin interaction with metals: Evidence of structural changing processes in aqueous solution and on metal nanoparticles. *Journal of Molecular Structure*, 2009, 918(1–3), 129–137.
17. PROKOPEC, V., J. CEJKOVA, P. MATEJKA AND P. HASAL Preparation of SERS-active substrates with large surface area for Raman spectral mapping and testing of their surface nanostructure. *Surface and Interface Analysis*, // 2008, 40(3–4), 601–607.
18. AGNIHOTRI, S., S. MUKHERJI AND S. MUKHERJI Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*, 2014, 4(8), 3974–3983.
19. KOKAISLOVÁ, A. AND P. MATEJKA Surface-enhanced vibrational spectroscopy of B vitamins: What is the effect of sers-active metals used? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 403(4), 985–993.
20. DENDISOVÁ-VYŠKOVSKA, M., A. KOKAISLOVÁ, M. ONČÁK AND P. MATEJKA SERS and in situ SERS spectroscopy of riboflavin adsorbed on silver, gold and copper substrates. Elucidation of variability of surface orientation based on both experimental and theoretical approach. *Journal of Molecular Structure*, 2013, 1038, 19–28.